



Adaptation de l'Archaea halophile halobacterium salinarum aux stress environnementaux : mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire

Vincent Marty

► To cite this version:

Vincent Marty. Adaptation de l'Archaea halophile halobacterium salinarum aux stress environnementaux : mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV087 . tel-01328136

HAL Id: tel-01328136

<https://theses.hal.science/tel-01328136>

Submitted on 27 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : du 7 août 2006

Présentée par

Vincent Marty

Thèse dirigée par **Bruno Franzetti**

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale**
et de l'**Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Adaptation de l'Archaea halophile *Halobacterium salinarum* aux stress environnementaux : mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire.

Thèse soutenue publiquement le **9 Décembre 2011** ,
devant le jury composé de :

M. Mohamed Jebbar

Professeur universitaire, CNRS-Ifremer-UBO, Rapporteur

Mme. Véronique Baldin

Chercheur CR1, CNRS, Rapporteur

M. Cédric Norais

Maitre de conférence, Ecole Polytechnique, Examineur

M. Giuseppe Zaccai

Directeur de Recherche, ILL, Examineur

M. Bruno Franzetti

Directeur de Recherche, CNRS, Directeur de thèse



Table des matières

I	Introduction	16
1	Les Archaea	17
1.1	Habitats et généralités	17
1.2	Classifications	18
2	Les archées halophiles	20
2.1	Habitats et généralités	20
2.2	Classification	22
2.3	Stratégies d'adaptations aux conditions salines extrêmes	22
2.3.1	L'adaptation cellulaire au sel des archées halophiles	23
2.3.2	Adaptation moléculaire des protéines halophiles	25
3	L'organisme modèle <i>Halobacterium salinarum</i>	31
3.1	Conditions de croissance, tolérances aux conditions environnementales et réponse aux stress chez <i>Halobacterium salinarum</i>	34
3.1.1	Définition du stress	34
3.1.2	Les conditions de culture normales pour H.s. :	35
3.1.3	Les types de stress que peut rencontrer H.s.	35
4	L'organisme <i>Haloferax volcanii</i> (Hv)	37
5	La protéolyse intracellulaire	38
5.1	Les fonctions	38

5.1.1	Rôle général de la protéolyse	38
5.1.2	Rôle de la protéolyse dans l'extrémophilie des halophiles	41
5.2	Les acteurs	41
5.2.1	Les Principaux acteurs eucaryotes pour la dégradation des protéines solubles	41
5.2.2	Les principaux acteurs bactériens	47
5.2.3	Les principaux acteurs archéens	48
6	L'aminopeptidase TET	51
6.1	Les aminopeptidases	51
6.2	La protéine TET	52
7	Objectifs de la thèse	59
II	Détermination des mécanismes moléculaires permettant la survie de l'archée halophile <i>Halobacterium salinarum</i> dans des conditions de basse salinité	62
8	Effet du sel sur la dynamique in vivo du protéome de <i>Halobacterium salinarum</i>	63
8.1	Mesure de la dynamique moléculaire des protéines par diffusion de neu- trons in vivo	65
8.1.1	La dynamique moléculaire des protéines	65
8.1.2	La technique de diffusion de neutrons pour des analyses de dy- namiques moléculaires d'échantillons biologiques	69
8.1.3	Interprétation des données de diffusion neutronique	75
8.2	Résultats	77
8.2.1	Choix de la gamme de Q utilisée pour le traitement des données de <i>H.salinarum</i> : étude de l'influence du choix de la gamme de Q sur les données de diffusion neutronique sur <i>E.coli</i>	77

8.2.2	Mesure de la résilience moléculaire du protéome <i>Halobacterium salinarum</i>	86
8.2.3	Modification de la dynamique moléculaire du protéome de <i>H. salinarum</i> dans des conditions expérimentales hyposalines	89
8.2.4	Modification de la dynamique moléculaire lors des stress thermiques	96
8.2.5	Etude de l'induction du complexe chaperon TF55 lors des stress	99
8.2.6	Influence de l'intégrité cellulaire sur la dynamique du protéome d'un organisme mésophile(<i>E.coli</i>) et halophile(<i>H. salinarum</i>) . .	100
8.3	Discussion	102
9	Mise en évidence d'un mécanisme de survie à la basse salinité chez <i>Halobacterium salinarum</i>	104
9.1	Résultats	107
9.1.1	<i>Halobacterium salinarum</i> peut survivre à des conditions hyposalines extracellulaires	107
9.1.2	Mesure de la concentration intracellulaire en K ⁺ au cours de stress hypo-salins progressifs.	112
9.1.3	La survie des cellules en condition de basse salinité s'accompagne de changement morphologiques	115
9.1.4	Mise en évidence d'une nouvelle forme d'adaptation au stress. .	122
9.2	Discussion	126
III	Contribution à la compréhension du rôle du système protéolytique PAN-protéasome chez l'Archaea halophile extrême <i>Halobacterium salinarum</i>	129
10	Résumé de l'article 1 voir annexe 16 : Régulation du système protéolytique PAN-protéasome au cours de stress thermiques et hypo-salin chez <i>Halobacterium salinarum</i>.	130
10.1	Introduction	131

10.2 Résultats	131
10.2.1 Régulation de l'activité endopeptidasique et de la transcription du système PAN-protéasome pendant la croissance cellulaire. . .	131
10.2.2 Régulation de l'activité endopeptidasique et de la transcription du système PAN-protéasome au cours de la réponse aux stress. .	135
10.2.3 Etat d'oligomérisation et interactions physiques des protéines PANA et PANB chez <i>Halobacterium</i>	138
10.2.4 Les cellules <i>Halobacterium</i> peuvent maintenir leur croissance cel- lulaire dans des conditions normales et de stress malgré une déficience du protéasome.	140
10.3 Données supplémentaires à l'article 16 : Etude de l'effet de différentes drogues sur l'activité du protéasome de <i>Halobacterium salinarum</i> in vitro et in vivo	143
10.3.1 Effet des drogues sur la croissance	144
10.3.2 Effet des drogues sur l'activité du protéasome	145
10.4 Discussion	151

IV Etude du rôle de l'aminopeptidase TET dans la protéolyse intracellulaire chez les archées halophiles in vivo 152

11 Etude du rôle de TET chez l'archée halophile <i>Haloferax volcanii</i> par la détermination du phénotype d'un mutant délété d'un des gènes codant pour la protéine TET	154
11.1 Résultats	155
11.1.1 Influence de la présence de la protéase TET au cours de la crois- sance	155
11.1.2 Influence de la présence de la protéase TET au cours d'un stress Hypo-salin	157

11.1.3	Influence de la présence de la protéase TET au cours de stress nutritionnel	158
11.1.4	Mesure de l'activité amino-peptidasique totale et importance de la peptidase TET	161
11.2	Discussion	166
12	Etude du rôle de TET chez l'archée halophile <i>Halobacterium salinarum</i>	170
12.1	Résultats	170
12.1.1	Les différentes formes de TET dans le cytoplasme	170
12.1.2	Contribution de la protéase TET dans l'activité amino-peptidasique totale	172
12.1.3	Accumulation et recrutement de la forme 12 sous-unités de la protéase TET au début de la phase stationnaire	175
12.1.4	Essai de dosage de l'activité enzymatique de la peptidase TET après d'immuno-précipitation à haut sel	179
12.1.5	Disparition de la protéase TET lors de stress	180
12.1.6	Accumulation et recrutement de la forme 12 sous-unités de la protéase TET au cours de carences nutritionnelles	184
12.2	Discussion	188
V	Conclusion générale et perspectives	191
VI	Matériels et méthodes	194
13	Croissance et manipulation du matériel vivant utilisé	195
13.1	Milieus de culture	195
13.1.1	Milieu et conditions de croissance optimum d' <i>Halobacterium salinarum</i>	195

13.1.2	Milieu et conditions de croissance optimum d' <i>Haloferax volcanii</i>	196
13.1.3	Milieus de croissance pour stress nutritionnels d' <i>Halobacterium salinarum</i>	196
13.1.4	Milieus de croissance pour stress nutritionnels d' <i>Haloferax volcanii</i>	197
13.1.5	Milieus pour le stress bas sel d' <i>Halobacterium salinarum</i>	199
13.2	Suivi de la croissance	199
13.2.1	Densité optique	199
13.2.2	Comptage sur boîte	200
13.2.3	Comptage par microscopie	201
13.2.4	Mesure de la viabilité (technique Live/Dead)	202
13.3	Stress physiques	203
13.3.1	Stress bas salinité	203
13.3.2	Stress haute température	204
14	Biochimie des protéines	205
14.1	Extractions et échantillonnage	205
14.2	Précipitation à l'acide trichloracétique (TCA)	206
14.3	Dosage	206
14.4	Séparation	207
14.4.1	Séparation par électrophorèse et détection des protéines (Coomassie, Argent, Western-Blot)	207
14.4.2	Séparation par gradient de sucrose	210
14.4.3	Immuno-précipitation à haut sel de la protéase TET	210
14.5	Mesure de l'activité amino-peptidasique	211
15	Technique de biophysique	213
15.1	Microscopie : visualisation des changements morphologiques	213
15.1.1	Microscopie par fluorescence pour visualisation des membranes	213
15.1.2	Microscopie électronique coloration négative	214
15.1.3	Microscopie électronique par balayage	214

15.1.4	Microscopie électronique par coupe	214
15.2	Dosage des ions intracellulaires	215
15.3	Dynamique moléculaire par diffusion de neutron	216
15.3.1	Préparation des échantillons	216
15.3.2	Analyse des données	217
VII	Annexes	218
16	Thermal and salt stress regulation of the PAN-proteasome system in the extreme halophilic Archaeon Halobacterium.	219
VIII	Bibliographie	221

Table des figures

1.1	Arbre phylogénétique hypothétique de tous les organismes vivants. . . .	19
2.1	Représentation schématique des transporteurs membranaires de <i>Halo-</i> <i>bacterium salinarum</i> permettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire	25
2.2	Structure tétramérique de la HMDH	29
2.3	Comparaison de la surface électrostatique résultant de la composition en acide aminés acido-basique de la surface d'une malate déshydrogénase acidophile et et halophile.	30
5.1	Schéma récapitulatif des différents rôles de la protéolyse cytoplasmique chez les archées et position du système PAN-protéasome.	50
6.1	Structure de l'enveloppe du complexe TET de l'archéehalophile <i>H.marismortui</i>	53
6.2	Microscopie électronique de PhTET1	55
6.3	Structure du dimère dans les deux complexes (12ss et 24ss) de PhTET1	56
6.4	Structures internes du complexe de PhTET1 à 12 sous-unités.	57
8.1	Les échelles de temps des mouvements fondamentaux de dynamique moléculaire des protéines	66
8.2	Représentation du degré d'encombrement dans le cytoplasme d' <i>E.coli</i> .	67
8.3	Porte échantillon et culot de <i>Halobacterium</i> pour les études de diffusion de neutrons	70
8.4	Photo de l'instrument IN13 de l'ILL	71
8.5	Principe du spectromètre à rétrodiffusion IN13 de l'ILL	72

8.6	Processus de diffusion d'un neutron	72
8.7	Exemple d'une mesure de diffusion de neutrons de l'organisme <i>e.coli</i> . .	74
8.8	Courbe $\langle u^2 \rangle$ en fonction de la température de l'organisme <i>e.coli</i> . . .	76
8.9	Comparaison de la dynamique moléculaire d'un échantillon d' <i>E.coli</i> et de son tampon à différentes températures.	79
8.10	Comparaison de la dynamique moléculaire entre deux échantillons différents de <i>E.coli</i> et choix de la gamme de Q^2 pour le fit permettant d'obtenir la valeur de $\langle u^2 \rangle$	81
8.11	Comparaison des $\langle u^2 \rangle$ obtenues pour les données mai et juillet 2011 pour l'organisme <i>E.coli</i> en fonction du choix de la gamme en Q^2	83
8.12	Comparaison des valeurs des $\langle k' \rangle$ obtenues pour les différentes gammes de Q^2 pour les données de <i>E.coli</i> mesurées en Mai et en Juillet.	85
8.13	Comparaison de la flexibilité et de la résilience macromoléculaire moyenne $\langle k' \rangle$ (rigidité) d' <i>Halobacterium</i> et d'une mésophile (<i>E.coli</i>).	88
8.14	Comparaison de la dynamique moléculaire entre un protéome intact de <i>H.salinarum</i> et des cellules lysées de <i>H.salinarum</i> par choc osmotique .	90
8.15	Suivi de la croissance de cultures d' <i>H.salinarum</i> en conditions optimales (4,2M, 37°C) et de cultures soumises à t=0 à différents stress environ- nementaux	92
8.16	Tableau résumant les résultats de viabilité de l'organismes <i>H.salinarum</i> soumis aux différentes conditions de stress	93
8.17	Tableau résumant les résultats de dosage de la concentration en K^+ intracellulaire de l'organismes <i>H.salinarum</i> soumis aux différentes conditions de stress hypo-salins	94
8.18	Effets des conditions environnementales hypo-salines sur la dynamique moléculaire du protéome de <i>H.salinarum</i>	95
8.19	Comparaison de la dynamique moléculaire entre un protéome intact de <i>H.salinarum</i> et des cellules lysées de <i>H.salinarum</i> par choc thermique .	97

8.20	Effets du stress thermique sur la dynamique moléculaire du protéome de <i>H.salinarum</i>	98
8.21	Accumulation de la sous-unité α du Thermosome chez <i>H.salinarum</i> en fonction des stress environnementaux thermiques et hypo-salins	99
8.22	Effets de l'intégrité de la membrane et des petits soluté sur la dynamique totale du protéome de <i>H.salinarum</i>	100
8.23	Effets de l'intégrité de la membrane et des petits solutés sur la dynamique totale du protéome de <i>H.salinarum</i>	102
9.1	Effet d'une dilution avec un tampon sans sel sur une culture de <i>H.salinarum</i>	105
9.2	Système expérimental permettant une dilution progressive	106
9.3	Micrographies de cellules d' <i>H.salinarum</i> en condition de croissance normale (4,2M) et soumis en fin d'un stress progressif de 5 jours (concentration extracellulaire en NaCl = 0,5M)	108
9.4	Viabilité de <i>H.salinarum</i> lors du passage de 4.2M à 0.5M en fonction de la vitesse de dilution des cultures avec un tampon sans sel	109
9.5	Système de milieu solide pour étaler des cellules adaptées	111
9.6	Suivi de la concentration en K^+ à l'intérieur du cytoplasme au cours d'un stress bas sel	113
9.7	Comparaison de la forme des cellules d' <i>Halobacterium salinarum</i> à différentes concentrations extracellulaires de NaCl	115
9.8	Changement morphologique au cours d'un stress bas sel	117
9.9	Comparaison des cellules en conditions normales et après un stress bas sel par microscopie	120
9.10	Comparaison de la surface de la membrane et du volume de la cellule en conditions normales et en conditions de stress bas sel	122
9.11	Etat du protéome lors d'un stress salin progressif	124

10.1	Modifications de l'activité du protéasome 20S et de l'expression des sous-unités du complexe PAN-protéasome lors de la croissance cellulaire chez <i>Halobacterium</i>	133
10.2	Induction de l'activité du protéasome 20S et quantification de l'accumulation de transcript des quatre gènes codant pour les sous-unités du système PAN-protéasome lors d'une réponse à un <i>stress thermique</i> chez <i>Halobacterium</i>	136
10.3	Induction de l'activité du protéasome 20S et quantification de l'accumulation de transcript des quatre gènes codant pour les sous-unités du système PAN-protéasome lors d'une réponse à un <i>stress hypo-salin</i> chez <i>Halobacterium</i>	137
10.4	Détection par co-immunoprécipitation des interactions physiques entre les sous-unités ATPasiques régulatrices du protéasome PANA et PANB .	139
10.5	Effets de l'inhibition du protéasome dans des conditions normales de croissance ainsi que dans des conditions de choc thermique	141
10.6	Suivi de la croissance cellulaire d' <i>Halobacterium</i> traité avec les différentes drogues	144
10.7	Mesure de l'activité endo-peptidasique après inhibition ou non du protéasome in vivo par les différentes drogues.	146
10.8	Mesure de l'activité endopeptidasique sur les fractions de bas poids moléculaire et de haut poids moléculaire au cours de la croissance cellulaire	147
10.9	Mesure de l'activité endo-peptidasique après inhibition ou non du protéasome in vitro par les différentes drogues.	149
11.1	Comparaison morphologique des deux souches	155
11.2	Suivit et comparaison de la croissance en condition optimale de l'organisme <i>H.volcanii</i> et du mutant CN5	156
11.3	Comparaison de la croissance des deux souches lors de choc hypo-salin.	158

11.4	Comparaison de la croissance de <i>H.volcanii</i> WT et CN5 en fonction de différents milieux nutritionnels	160
11.5	Détermination d'un profil d'activité amino-peptidasique en condition de carence nutritionnelle.	163
11.6	Mesure de l'activité amino-peptidasique en milieu normal HvYPC. En présence de Cobalt. En blue Hv WT en rouge Hv CN5.	165
11.7	Figure hypothétique traçant le rôle de TET en présence de peptone comme unique source de nutriment.	168
11.8	Figure hypothétique traçant le rôle de TET en présence d'acides aminés comme unique source de nutriment.	169
12.1	Calibrage du gradient de sucrose, les trois formes de TET de <i>H.salinarum</i> in vivo	171
12.2	Mesure de l'activité amino-peptidasique totale chez l'organisme <i>H.salinarum</i>	173
12.3	Correspondance entre la localisation de l'activité amino-peptidasique dans le gradient et la place de la protéase TET	174
12.4	Tableau récapitulatif des métallo-protéases référencées chez <i>H.salinarum</i>	175
12.5	Quantification de l'accumulation de la protéase TET et de l'activité amino-peptidasique totale au cours des différentes phases de la croissance cellulaire chez <i>H.salinarum</i>	176
12.6	Comparaison de la localisation lors d'un gradient de sucrose 5-20% de l'activité amino-peptidasique et de la protéase TET au cours de la croissance	177
12.7	Vérification de l'immuno-précipitation de TET <i>H.salinarum</i> à haut sel.	180
12.8	Profil d'accumulation de la protéase TET au cours du temps en présence d'un stress hypo-salin et haute température.	181
12.9	Mise en évidence du lien entre l'intensité du stress hypo-salin et la vitesse de disparition de la protéase TET	182

12.10	Révélation par immuno-détection des formes de TET présentes lors d'un stress hypo-salin et thermique	183
12.11	Comparaison de la concentration de la protéase TET accumulée dans le cytoplasme au cours de stress nutritionnels	185
12.12	Immuno-révélation par Western-blot de la protéase TET pour les cultures soumises à un stress nutritionnel.	186
12.13	Comparaison de la quantité des différentes formes de TET accumulées lors de stress nutritionnels.	187
13.1	Représentation schématique d'une lame de numérotation Neubauer . .	201

Liste des abréviations

BPM fractions de bas poids moléculaire

cL β L béta-lactone

DO Densité optique

hMDH malate déshydrogénase d'*Haloarcula marismortui*

HPM fractions haut poids moléculaire

Hs *Halobacterium salinarum*

Hv *Haloferax volcanii*

Hv-MDH malate déshydrogénase d'*Haloferax volcanii*

IBS Institut de Biologie Structurale de Grenoble

KCL Chlorure de potassium

LDH lactate déshydrogénase

M Molarité

MDH malate déshydrogénase

NaCl Chlorure de sodium

NLVS NIP-Leu3-vinylsulfone ou 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone

p/v poids/volume

PhTET1 peptidase TET1 de *Pyrococcus horikoshii*

PI1 Protease 1 Inhibitor

Pt-MDH malate déshydrogénase d'*Picrophilus torridus*

TET Aminopeptidase tétraédriques

TRI protéase Tricorne

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Les Archaea

1.1 Habitats et généralités

Les "Archaea" ou "archées" sont présentes dans des environnements extrêmement diversifiés. En effet certains groupe d'archées se singularisent par leur capacité à se développer dans les environnements les plus extrêmes connus sur terre : température (jusqu'à plus de 100°C), hautes pressions (fond des océans, jusqu'à 1000Bar), hypersalinité (jusqu'à 6M de sel), haute acidité (jusqu'à pH proche de 0), UV,... ([1] [2]). Ces organismes capables de vivre dans ces niches écologiques aux conditions extrêmes sont souvent les seules à les occuper. A ce titre, ces organismes représentent de bons modèles pour comprendre les adaptations cellulaires aux milieux extrêmes ([3]).

Toutefois, il existe aussi beaucoup d'archées vivant dans des biotopes plus courants comme le sol, les lacs, la mer ou l'intestin des animaux.

Il n'y a pas d'exemple clairement reconnu d'archées pathogènes ou parasites, mais il existe des espèces mutualistes ou commensales. Par exemple, les archées méthanogènes du tractus intestinal de l'Homme et des ruminants participent à la digestion des aliments. Elles contribueraient jusqu'à 20% du total de la biomasse de la terre.

1.2 Classifications

Des analyses génétiques de ce groupe de procaryote ont montré que les archées se différenciaient grandement des autres microorganismes. En 1977, Carl Woese élaborent un arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S. En 1990, la génomique comparative vient valider l'affectation des archées à un troisième domaine différent de celui des bactéries et des eucaryotes (arbre universel basé sur l'ARN 16S et sur les protéines ribosomiques)[4].

Les archées sont remarquablement similaires aux bactéries à bien des égards, en particulier pour la taille et l'organisation de leurs chromosomes, la présence des unités de transcription polycistronique et l'utilisation de séquences de Shine-Dalgarno pour l'initiation de la traduction (mais pas exclusivement ; [5]).

Les analyses faites sur les génomes complets d'archées publiés à ce jour (www.tigr.com) montrent que les protéines du métabolisme sont essentiellement de nature bactérienne. Toutefois malgré leurs ressemblances avec les bactéries, les archées présentent aussi de nombreuses caractéristiques eucaryotes [6]. Ainsi, les protéines classées dans le groupe de fonction "processus cellulaires" (réplication, transcription, traduction, dégradation des ARNm, protéolyse...) sont essentiellement de nature eucaryote [7]. Par exemple l'appareil de réplication de l'ADN : les primases, les hélicases et les polymérases des archées et des eucaryotes, sont totalement étrangers à leurs homologues bactériens [8]. Toutefois les systèmes moléculaires décrits chez les archées présentent une simplicité en terme de nombre de composants, comparés à leurs homologues eucaryotes. En résumé on pourrait voir les archées comme des organismes qui utilisent des complexes de protéines simplifiés de type eucaryote dans un contexte de type bactérien [9] [10] [11].

Malgré les similitudes à la fois bactériennes et eucaryotes, les archées possèdent des caractéristiques uniques qui les distinguent radicalement des deux autres domaines, comme la stéréochimie de leur molécule du glycérol et de leurs phospholipides. Tous les phospholipides membranaires des archées sont des éthers isoprénoïdes construits sur

Arbre phylogénétique de la vie

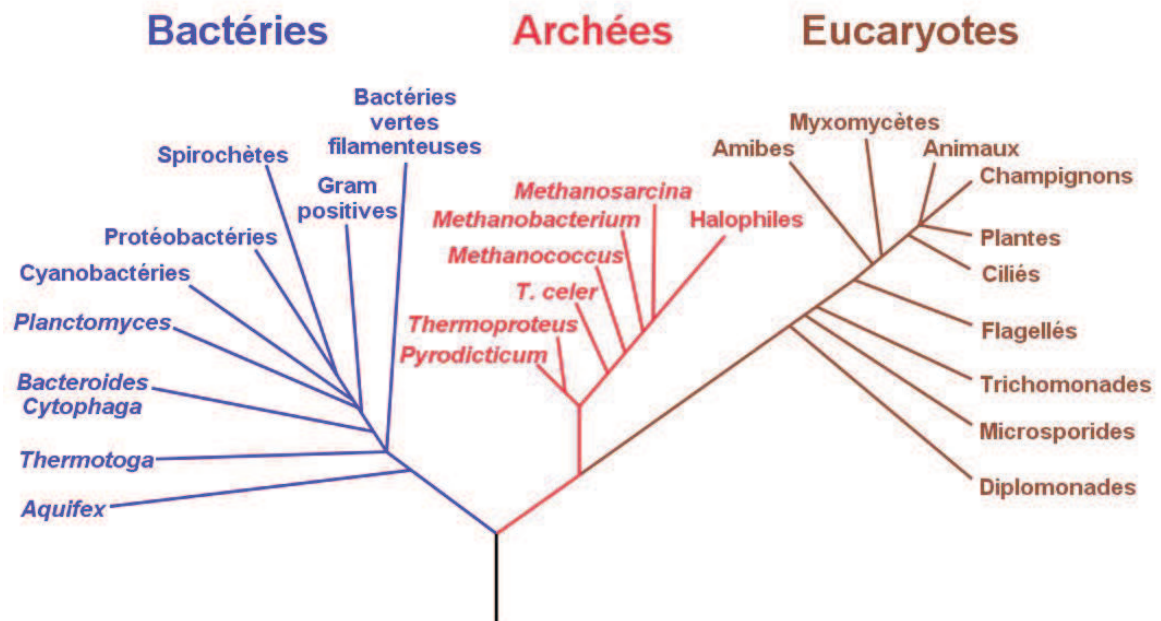


FIGURE 1.1 – Arbre phylogénétique hypothétique de tous les organismes vivants. L'arbre est basé sur des séquences de l'ARNr 16S. À l'origine proposé par Carl Woese, il montre l'histoire évolutive des trois domaines du vivant (bactéries, archées et eucaryotes).

le glycérol-1-phosphate (G1P), tandis que les membranes bactériennes et eucaryotes contiennent des esters d'acides gras liés au stéréo-isomère du glycérol-3-phosphate (G3P) [12].

Chapitre 2

Les archées halophiles

2.1 Habitats et généralités

Les archées halophiles peuvent être classées en trois catégories : les légèrement halophiles (optimum de croissance entre 2 et 5% P/V de NaCl) ; les halophiles modérées (optimum de croissance entre 5 et 20% p/v de NaCl) ; et les halophiles extrêmes (optimum de croissance entre 20 et 30% p/v de NaCl).

Les organismes halophiles ont été isolés dans des lacs, des étangs salés, dans des marais salants ou dans des sédiments marins. Ils peuvent être par exemple rencontrés dans le Grand Lac Salé en Utah, le Lac Owens en Californie, la Mer Morte, les estuaires de la Baie de San Francisco, le Lac Magadi au Kenya, la lagune de Venise en Italie.

Parmi les exemples d'archées halophiles, l'ordre des Halobacteriales comprend les genres *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronococcus*.

La concentration saline dans les environnements hyper-salés (comme la mer morte ou les grands lacs salés) est proche du niveau de saturation pour le chlorure de sodium [13]. L'évaporation à la surface de l'eau provoque un rapprochement des molécules de sel entre elles, ce qui provoque la formation de petits cristaux de sel qui flottent à la surface de la saumure. Ces petits cristaux croissent ensuite par l'ajout de nouvelles molécules de sel sur leurs bords. Comme le cristal devient plus lourd, il ne flotte

plus et s'enfonce progressivement plus bas dans la saumure. Ce phénomène entraîne la formation de grosses pyramides cristallines. Enfin, ces pyramides continuent de croître jusqu'à la surface. Quand ces pyramides de cristaux salins se forment, de petites poches de saumure sont piégées dans la structure. Comme le taux de croissance du cristal augmente, la quantité des inclusions fluidiques augmente également. De plus la quantité d'inclusions fluidiques est plus importante dans le centre du cristal [14]. Dans ces inclusions sont parfois piégés des archées halophiles, qui restent viable du fait de la présence d'eau libre, pendant de nombreuses années [15] [16].

Diverses espèces d'archées halophiles ont été remises en culture à partir de cristaux de sel anciens [15] [16]. La quantité de cristaux anciens qui abritent les halophiles viables est toutefois faible. Dans une étude de 52 cristaux de sel vieux de 250 millions d'années, seulement 2 cristaux étudiés contenaient des archées ayant survécues à la "dormance" [16].

Les effets de l'épuisement des ressources peuvent également être observés dans les cristaux de sel récemment formés. En effet, il a été constaté que certaines archées halophiles ayant une forme de bâtonnet en conditions normales de croissance, deviennent sphériques dans les deux ou trois semaines après la formation des cristaux. Ce pléomorphisme est typique des archées halophiles en forme de bâtonnet dans des états de carence [17].

En plus d'un milieu riche en sel, ces organismes sont soumis à d'autres types de stress, comme les UV.

La plus part des archées halophiles sont colorées en rouge orangé. Cette couleur est due à l'incorporation de caroténoïdes dans leur membrane cellulaire. Ces molécules (antioxydante) contribuent à la photoprotection, permettant aux cellules de vivre dans un environnement avec d'intenses radiations d'UV. Les autres moyens de protection contre les UV utilisés par ces organismes sont un système de réparation de l'ADN efficace et un faible nombre de "cibles" UV dans leurs génomes (thymine).

Certaines espèces ont aussi une couleur pourpre, dans ces cas là la membrane incorpore de la bactériorhodopsine (chromoprotéine pourpre) ou d'autres rhodopsine-

chromo-protéines [18]. L'exposition à la lumière UV est nécessaire pour l'activation de la bactériorhodopsine. Le rôle de cette protéine est de créer un gradient de proton entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire afin de synthétiser de l'ATP.

Certaines espèces d'archées comme *Halobacterium*, pour utiliser au mieux la quantité d'UV du milieu produisent aussi des vésicules de gaz. Cette technique leur permet de flotter à la surface de la colonne d'eau où la lumière (UV) et l'oxygène sont facilement accessibles afin d'activer au mieux leur système de production d'énergie.

2.2 Classification

Les archées halophiles étudiées au laboratoire proviennent de la Mer Morte, de lacs hypersalins, de marais salants ou de poissons salés contaminés. Ces organismes ont une forte pigmentation rouge orangée ou pourpre. Nous avons étudié et utilisé au cours de ma thèse deux organismes halophiles différents : *Halobacterium salinarum* (Hs) et *Haloferax volcanii* (Hv). Ces deux organismes seront présentés dans le chapitre 3 pour Hs et dans le chapitre 4 pour Hv.

2.3 Stratégies d'adaptations aux conditions salines extrêmes

En général, les organismes non halophiles tolèrent des niveaux de NaCl à 0,2 mol/L. Les effets d'une forte concentration en sel sur ces organismes non adaptés sont :

- la précipitation des biomolécules,
- une forte pression osmotique,

- une déshydratation cellulaire et donc une dessiccation.

Les archées halophiles se développent cependant dans des niveaux de NaCl à plus de 3,5 mol/L. Quels sont les mécanismes mis en jeu par les organismes pour vivre dans un environnement hyper salé ?

2.3.1 L'adaptation cellulaire au sel des archées halophiles

Osmoprotectants

L'exclusion du sodium et la synthèse ou l'accumulation de solutés compatibles sont des réponses au stress hyper-osmotique adoptés par de nombreux microorganismes eucaryotes et bactériens, mais aussi par des archées halophiles méthanogènes [18]. Les solutés compatibles peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), certains acides aminés et dérivés (proline, acide glutamique, glutamine, glycine bêtaïne), éctoïne (et dérivés) ou des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol). L'osmoprotecteur le plus fréquemment observé est la glycine bêtaïne [19]. Il est utilisé par de nombreux microorganismes halophiles et halo-tolérants tels que les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archées méthanogènes.

Les archées halophiles qui utilisent cette stratégie ont des pompes transmembranaires ions-sélectives efficaces ainsi que des voies spécifiques pour la synthèse d'osmolytes. Les voies de biosynthèse des solutés organiques, à l'exception de celle de la glycine bêtaïne, dérivent de la synthèse du glutamate et de l'aspartate. Le mode d'action des osmoprotecteurs est loin d'être clair. Ils pourraient n'être que des solutés compatibles permettant de maintenir l'osmolarité de la cellule vis à vis de l'environnement ou ils pourraient aussi jouer un rôle protecteur actif en interagissant avec les protéines et les protégeant [20], de tel sorte que leur présence dans le cytoplasme n'exige pas une adaptation particulière des protéines cellulaires.

Accumulation de sel

La seconde stratégie, adoptée par la plus part des archées halophiles, est l'accumulation intracellulaire de KCl [21] [22] [23]. Une concentration en ion K^+ de 5,0 M a été mesurée chez *Hs* lorsque la croissance a lieu à 4,0 M en ion Na^+ [21]. L'exclusion du Na^+ du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na^+/H^+ (nommé nhaC chez *Hs*) (voir schéma 2.1) , localisé au niveau de la membrane cytoplasmique. Généralement, les ions K^+ entrent passivement via un système uniport (nommés trkAH chez *Hs*) sous l'impulsion du potentiel de membrane. Ce système revient à remplacer une partie du sodium cellulaire par du potassium. De multiples systèmes de transport actif des ions K^+ (nommés kdpABC chez *Hs*) ont également été détectés dans le génome de *Halo-bacterium sp.* NRC-1 [24] (voir schéma 2.1).

La source principale d'énergie, pour l'expulsion du Na^+ et l'accumulation de K^+ dans les cellules d'archées, est la différence de potentiel électrochimique des protons. Le potentiel de repos (pour *Hs* environ de -100 à -125 mV) est la polarisation électrique en situation physiologique de repos d'une membrane plasmique. En introduisant une électrode de mesure à l'intérieur de la cellule (méthode de patch-clamp), il a été constaté une différence de potentiel : l'intérieur de la cellule est négatif et l'extérieur est positif [25] [26].

Cette différence de potentiel est due à la fois au transport des électrons dans la chaîne respiratoire, ainsi que par le gradient de protons formé lors de la synthèse de l'ATP par les ATPase membranaires et les antiporteurs de K^+ (KdpABC).

L'afflux de cations doit être compensé par un nombre équivalent d'anions. Le mouvement d'anions tel que le chlorure est couplé à l'énergie du potentiel de membrane. Il pénètre grâce à un symport Na^+/Cl^- . L'illumination des membranes actionne également une pompe qui fait entrer les ions Cl^- dans la cellule. Cette dernière fonction revient à une protéine contenant du rétinol appelé halorhodopsine chez *Hs* [27].

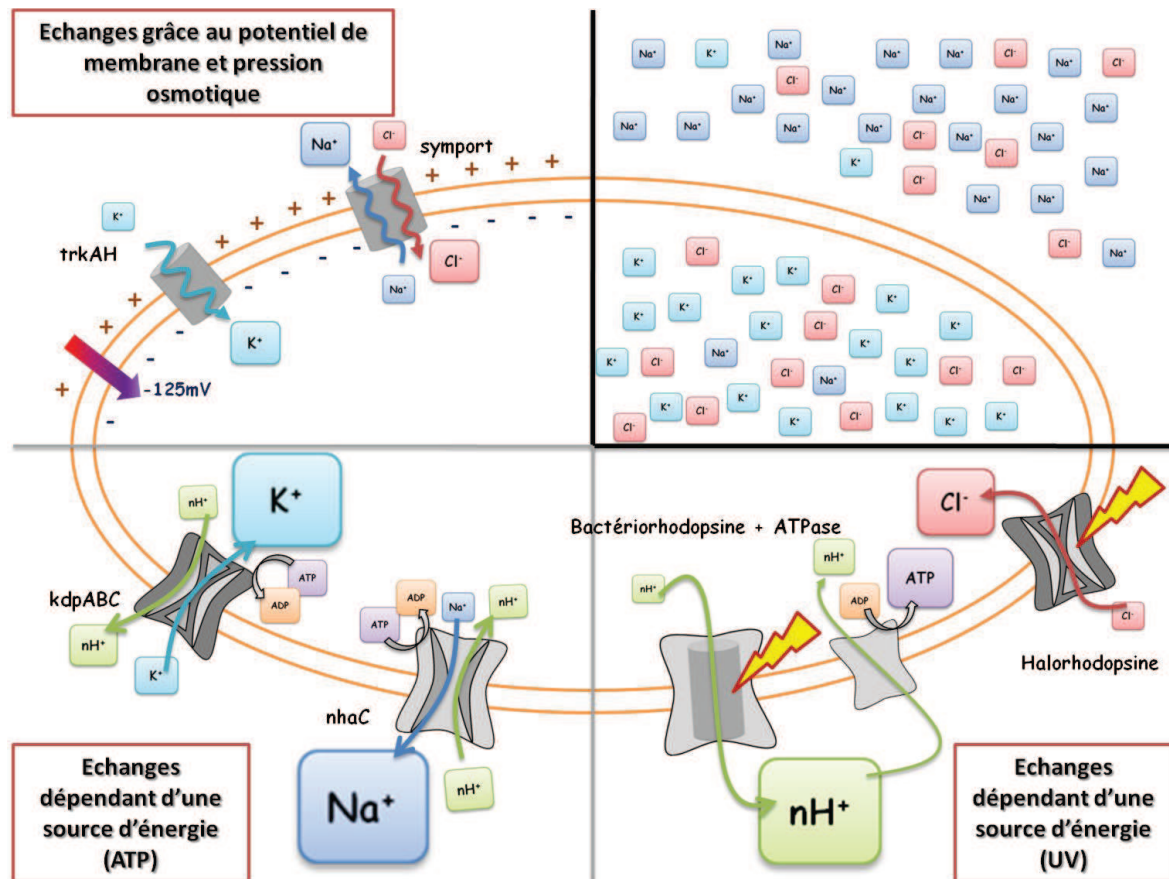


FIGURE 2.1 – Représentation schématique des transporteurs membranaires de *Halobacterium salinarum* permettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire. En haut à droite, représentation schématique de la localisation intracellulaires et extracellulaires des ions Na^+ , K^+ et Cl^- . En haut à gauche, transporteurs dont l'action dépend de la pression osmotique et du potentiel de membrane. En bas à gauche, transporteurs dont l'action dépend d'une source d'énergie chimique de type ATP. En bas à droite, transporteurs dont l'action dépend d'une source d'énergie physique de type UV.

2.3.2 Adaptation moléculaire des protéines halophiles

Les organismes, accumulant dans leur cytoplasme de fortes quantités de sel (principalement du KCl), se soumettent à un nouveau stress cellulaire : le stress salin. Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité des protéines d'organismes non adaptés aux conditions hyper-saline : la forte concentration en ion salin va neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité des protéines et rentrer en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau dis-

ponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci précipite.

Cependant, les organismes halophiles ne semblent pas connaître ce stress, leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles (stables, actives et flexibles) à de telles salinités, mais en plus elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1,0 à 2,0 M. Elles sont en ce sens qualifiées de protéines halophiles [28] [29] [30].

Le travail réalisé sur les systèmes protéiques au cours des 15 dernières années a mis en évidence plusieurs caractéristiques générales de l'adaptation moléculaire halophile via la stratégie de l'accumulation de KCl.

Du fait de la présence d'une forte concentration en sel dans le cytoplasme, les protéines halophiles ont nécessairement développé des mécanismes spécifiques pour la rétention de leur conformation native et de leur activités en milieu saturé en sel.

Tout d'abord, l'analyse statistique de 26 séquences de protéines halophiles a montré que la plupart des protéines halophiles (24 sur 26) sont très acides (excès de résidus acide par rapport au basique) par rapport aux non-halophiles [31], avec un potentiel isoélectrique moyen (pI) pour le protéome halophiles proche de 5.

Les structures cristallines de plusieurs protéines halophiles ont montré des surfaces riches en résidus acides. L'utilisation de résidus d'acides aminés chargés négativement conduit à une organisation des ions salins en réseau à la surface des protéines, qui renforce à la fois les interactions faibles particules-particules (répulsion) et les interactions protéine-solvant. La sélection d'une surface acide est donc nécessaire pour maintenir la solubilité des protéines dans un environnement en sel élevé.

De plus, de nombreuses protéines halophiles ont des sites de liaison aux ions, souvent à l'interface de sous-unité. La formation de ponts salins avec d'autres résidus va permettre d'augmenter la stabilité des protéines.

Il a aussi été démontré qu'une hydrophobicité relativement faible à la surface des protéines ainsi que dans les parties enfouies (cœur de la protéine) était une autre forme

d'adaptation aux conditions salines. En réduisant l'hydrophobicité de la surface externe de la protéine, l'attraction hydrophobe protéine-protéine est également diminuée [32]. Ainsi la réduction des résidus chargés positivement (principalement la lysine) permet d'améliorer la solubilité des protéines en augmentant la charge négative de la surface (déjà forte grâce aux résidus acides). La diminution de la surface hydrophobe enfouie entre les monomères est de plus susceptible de favoriser une plus grande flexibilité des sous unités. Pour l'enzyme malate déshydrogénase halophile, cette dernière caractéristique augmente la flexibilité des sous unités actives, lui permettant de garder une activité enzymatique correcte.

Pour la composition des protéines halophiles en particulier pour la composition de la surface des protéines, il y a donc une forte utilisation des résidus Asp, Glu (résidus chargés négativement), Thr (résidus hydrophiles) et une diminution de l'utilisation des résidus Lys, Met, Leu, Ile, et Cys. Dans ce type d'environnement hyper-salin, les résidus hydrophobes des protéines nouvellement synthétisées sont exposés à des concentrations élevées de sel, ce qui pourraient conduire à des interactions non-spécifiques inter-ou intramoléculaires des chaînes latérales, ce qui engendrerait de forte perturbation pour le repliement final de la protéine. Afin de minimiser ces possibilités, toutes les protéines halophiles solubles ont un nombre inférieur de résidus hydrophobes, de plus l'augmentation de la charge négative sur la surface des protéines halophiles contrecarre la constante diélectrique (qui se trouve être basse à la salinité élevée) et permet donc d'améliorer la solubilité des protéines.

Une étude récente de mutagénèse dirigée a souligné qu'une diminution de la surface accessible au solvant d'une protéine été aussi une caractéristique de l'adaptation halophile [33].

Enfin, au niveau structure secondaire des protéines halophiles (par rapport aux protéines non halophiles), il y a une plus grande tendance à la formation de structure de type pelote statique (random coil) et une plus faible tendance à la forme de structure de type hélicoïdales (hélices et feuillets). Un pourcentage plus élevé de la structure de type hélice, permet une augmentation globale de la rigidité de la protéine, par conséquence

une diminution du pourcentage de structure de type hélice chez les protéines halophiles rend probablement plus souples ces protéines.

La malate déshydrogénase , une protéine modèle pour étudié le caractère halophile des protéines : La malate déshydrogénase (MDH) est une enzyme clé qui catalyse la conversion de la malate en oxaloacétate (et inversement) dans le cycle de l'acide citrique.

Présente dans la plupart des organismes, la malate déshydrogénase existe comme une molécule homotétramérique (la sous unité possède un poids moléculaire aux alentours de 30 KDa) avec une structure proche de celle de la lactate déshydrogénase (LDH). Il est intéressant de noter que la séquence en acides-aminé de MDH d'archées est plus proche de celle de la lactate déshydrogénase LDH que celle de MDH d'autres organismes(cela indique qu'il existe un lien possible entre l'évolution de la LDH et MDH). Il sera donc plus intéressant de comparer les structures des MDH d'archée à des LDH des autres organismes.

La MDH d'archées halophile la plus étudiée à ce jour, est la MDH d'*Haloarcula marismortui*(hMDH) . La structure homotétramérique de la hMDH est représentée par la figure 2.2, cette structure à été obtenue par cristallographie au rayon X avec une résolution de 3,2Å par Dym et al en 1995 [34].

Depuis, plusieurs structures de cette protéine ont été réalisées avec une meilleure résolution. La comparaison des résidus de surface des différentes MDH (et LDH) provenant d'organismes halophile, thermophile, acidophile et mésophile, permet de visualiser la forte proportion de résidus acide de la protéine halophile en contact avec le solvant(sauf dans les régions où la présence d'acide aminé positif est nécessaire pour les fonction biologique) et donc le fort potentiel isoélectrique négatif. Sont représenté sur la figure 2.3 la surface électrostatique de la MDH de l'archée acidophile *Picrophilus torridus* (Pt-MDH) qui croit à un pH=0 et celle de l'archée halophile *Haloferax vol-*

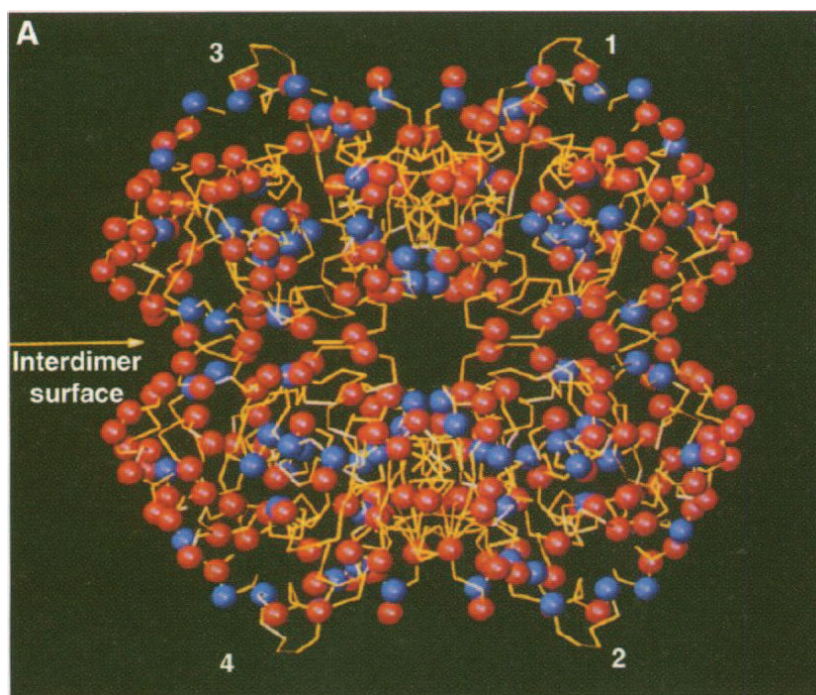


FIGURE 2.2 – **Structure tétramérique de la HMDH** : les acides aminés acides sont représentés en rouge et les basiques en bleu. Les nombres 1 à 4 désigne les différentes sous-unité de la protéine. Source Dym *et al* 1995 [34]

canii (Hv-MDH). Il est supposé que cette surface chargée négativement va permettre de recruter un grand nombre de molécules de solvant, créant une couche d'hydratation car les ions salins sont hydratés.

A partir des données structurales de la hMDH, il a été possible de déterminer d'autres particularités structurales, en particulier la présence de sites spécifiques de ponts ioniques à l'interface des sous-unités. Cette incorporation d'ions à l'intérieur de la structure va permettre de créer un très grand nombre de ponts et de réseaux salins entre les sous-unités (cette fonctionnalité est aussi utilisée pour la thermostabilité des protéines).

Depuis, ces données structurales ont été confirmées sur d'autres protéines halophiles, provenant aussi d'autres organismes halophiles.

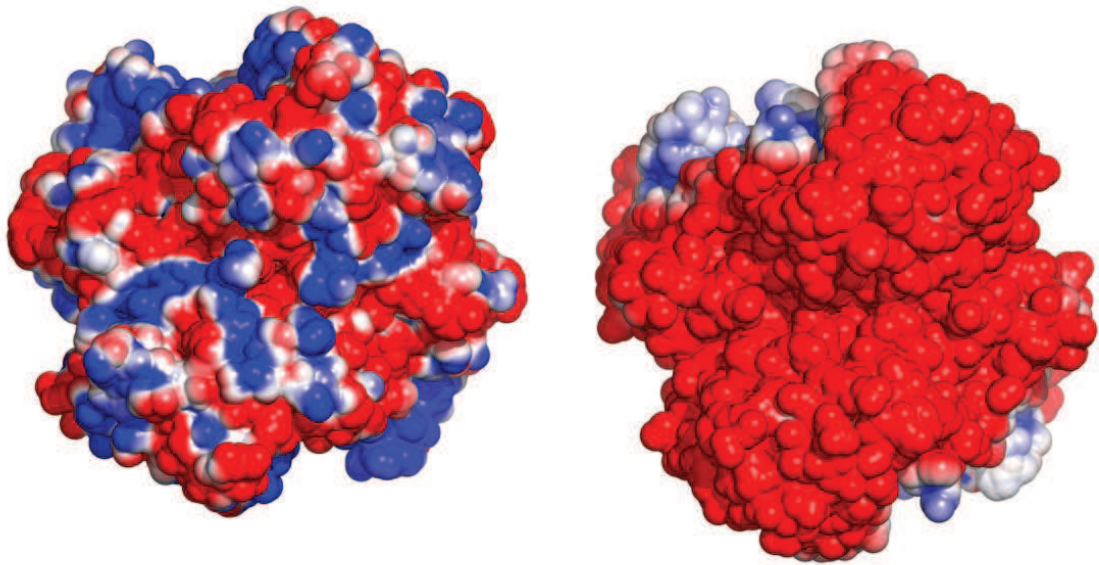


FIGURE 2.3 – Comparaison de la surface électrostatique résultant de la composition en acide aminés acido-basique de la surface d’une malate déshydrogénase acidophile et halophile. Structure tétramérique de la Pt-MDH (à gauche) et de la Hv-MDH (à droite), la surface électrostatique négative est représentée en rouge et positive en bleu. Structure et image réalisées par Romain Talon, groupe ELMA IBS.

Des organismes optimisés : Les organismes halophiles qui utilisent la stratégie d’accumulation de sel dans leur cytoplasmes sont optimisés pour des concentrations salines extracellulaires très élevées où l’eau libre est rare. De ce fait l’absence de sel devient une condition létale et la diminution de la concentration en sel devient une source de stress très importante pour ces organismes. L’impact d’une diminution en sel du milieu extracellulaire provoque dans un premier temps une entrée massive d’eau dans le cytoplasme (due à la forte pression osmotique engendrée par l’accumulation de K^+ dans le cytoplasme). Cette entrée massive va provoquer une destruction de la membrane et donc la lyse des cellules. De plus l’effet d’une forte proportion d’eau libre va provoquer une dénaturation des protéines, car comme vu dans le paragraphe précédent, le sel stabilise et est nécessaire à la conformation spatiale des protéines halophiles.[29][35]

Chapitre 3

L'organisme modèle *Halobacterium salinarum*

Halobacterium salinarum (Hs) est une espèce représentative d'un vaste groupe, la famille des halobactériacées (Phylum Euryarchaeota, Classe Halobacteria, Ordre Halobacteriales, Famille Halobacteriaceae). Cet organisme a été isolé sur des poissons ou des viandes salés, dans les lacs et mers hypersalins (comme la mer morte ou le lac de Magadi au Kenya) et dans certains marais salants (comme au Madagascar). Cet organisme a été découvert par Elazari-Volcani en 1957.

Généralité Les cellules Hs ont une forme de bâtonnet de 2 à 10 μm de long et de 0,4 à 0,7 μm de diamètre, munis de flagelles à une ou deux extrémités (5 à 10 filaments sur une extrémité en conditions de croissance optimum et 5 à 10 filaments sur chaque extrémité en conditions de carence). Ces flagelles leur permettent de se mouvoir afin de rechercher des conditions favorables pour leur croissance : présence de nutriments et d'oxygène. Les cellules possèdent une membrane formée de protéines et de lipides, typiques des archées (2.1). Elles n'ont pas de paroi mais sont enveloppées par une pellicule extra-membranaire, appelée couche S, formée de glycoprotéines reliées par des ions Mg_2^+ . Ces archées se développent dans des milieux contenant une concentration

extrêmement élevée en chlorure de sodium (entre 170 et 300g/L), près de dix fois celle de l'eau de mer (optimum de croissance à 4,2Mol/L, soit 250 g/L de NaCl), donc proche de la saturation (qui intervient vers 5,2 Mol/L, environ 300 g/L de NaCl). En conditions de croissance optimum, on peut trouver jusqu'à 100 millions de cellules par millilitre.

Limites par rapport au sel Hs a un besoin absolu d'une concentration élevée en sel, en particulier pour maintenir la structure de sa membrane et ne peut plus se multiplier si la concentration en sel (NaCl) devient inférieure à 2,5 Mol/L. Lorsque les cellules sont exposées à un milieu dont la concentration est inférieure à 1,5 Mol/L, les cellules éclatent du fait de la pression osmotique. La résistance de cet organisme à une concentration élevée en sel s'explique par leur capacité à équilibrer la pression osmotique du milieu intracellulaire par rapport à celle du milieu extracellulaire par une concentration interne en cations (K^+) particulièrement élevée. Grâce à divers systèmes de pompe, elles accumulent les ions potassium (K^+) dans leur milieu intracellulaire à des concentrations d'environ 4 à 5 Mol/L et expulse les ions sodium à l'extérieur de la cellule (il en reste néanmoins une concentration proche de 1 Mol/L dans le cytoplasme). Elles accumulent aussi activement les ions chlorures. Cette accumulation dépend de protéines transmembranaires dont l'une est une pompe à chlorures activée par la lumière, appelée halorhodopsine [36].

Métabolisme Hs présente un métabolisme énergétique lui permettant d'utiliser des sources d'énergie variées. Fondamentalement, c'est un chimio-organotrophe aérobique : cet organisme peut dégrader des substrats organiques en produisant de l'ATP par respiration aérobique, c'est-à-dire avec le di-oxygène (comme accepteur final du pouvoir réducteur ($H^+ + \text{électrons}$)) arraché aux substrats au cours du cycle de Krebs. La chaîne de transport des électrons, située dans la membrane plasmique, est constituée

d'enzymes qui sont proches sur le plan phylogénétique de celles des eubactéries aérobies. Les gènes qui les codent pour ces enzymes pourraient avoir été acquis par transfert horizontal à partir d'eubactéries. Dans la nature, les substrats organiques que ces archées utilisent comme source d'énergie : peptides, acides aminés, acides organiques, *etc.* proviennent généralement de la dégradation d'organismes moins halophiles qui meurent lorsque la salinité augmente excessivement. C'est pourquoi, on les cultive au laboratoire sur un milieu enrichi en substances organiques par de l'extrait de levure et de la peptone [24].

Hs a aussi une capacité de respiration anaérobie facultative. Dans ce cas, l'accepteur final des électrons est le DMSO (diméthylsulfoxyde) ou la TMAO (triméthylamine N-oxyde).

Enfin, lorsque la concentration en oxygène moléculaire est faible, Hs peut aussi devenir phototrophe, c'est-à-dire capable de produire de l'ATP en utilisant l'énergie lumineuse. Mais ce mécanisme n'a rien à voir avec la photosynthèse puisqu'il ne nécessite ni chlorophylle, ni bactériochlorophylle. La phototrophie de Hs dépend d'une protéine membranaire, appelée bactériorhodopsine, dont le maximum d'absorption se situe dans le visible à 560 nm, c'est-à-dire dans le vert, contrairement aux chlorophylles qui n'absorbent pas dans cette région du spectre lumineux. À la lumière, en l'absence d'oxygène dissout, les voies métaboliques conduisant à la synthèse de la bactériorhodopsine sont stimulées [24].

Les molécules de bactériorhodopsine sont organisées en trimères qui forment dans la membrane un arrangement para-cristallin bidimensionnel de forme hexagonale et lui confèrent une couleur pourpre. Le reste de la membrane, siège de la respiration, est rouge en raison de la présence de caroténoïdes. En pompant activement les protons intracellulaires vers l'extérieur à travers la membrane sous l'action de l'énergie lumineuse, la bactériorhodopsine rend le milieu intracellulaire plus alcalin que le milieu extracellulaire. Le gradient chimio-osmotique ainsi produit à la lumière est utilisé par une ATP synthase membranaire pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate. Il a

été calculé que la synthèse d'une molécule d'ATP nécessite l'absorption d'environ 22 photons [24].

3.1 Conditions de croissance, tolérances aux conditions environnementales et réponse aux stress chez *Halobacterium salinarum*

3.1.1 Définition du stress

Un stress est une perturbation de l'environnement qui soumet l'organisme à des contraintes (ou des pressions). Ces perturbations peuvent être de natures physiques (pression, radiation, température, dessiccation), environnementales (prédation, agression, compétition, liberté de mouvement), chimiques (toxine, métaux, oxygène, pH) ou nutritionnelle (carence).

Même si d'un point de vue d'un observateur extérieur, l'organisme "supporte" ces contraintes, d'un point de vue interne, de nombreux processus de survie rentrent en jeu pour permettre cette tolérance aux stress. Ces contraintes vont donc générer des stimuli qui vont provoquer une réponse de l'organisme.

Chaque organisme a une capacité d'adaptation propre à chaque type de perturbation, on parlera donc de limite de tolérance aux stress. La limite de tolérance est l'intensité maximum de stimuli que peut supporter un organisme. Une fois que l'intensité du stimulus passe cette limite de tolérance, le stress devient létal.

De plus, il est intéressant de voir qu'un organisme ayant déjà été soumis à un type de stress devient lui et ses descendants plus tolérants aux stress suivants du même type. Il existe donc une forme d'adaptation aux stress ou de sélection des processus de survie chez des organismes contraints à de nombreux stimuli. Par comparaison aux milieux générant des conditions de stress, on parlera donc de milieu environnemental normal

ou optimal, pour caractériser un environnement qui génère un minimum de sources de stress pour l'organisme (milieu Normal) ou même qui favorise son expansion (milieu Optimal).

3.1.2 Les conditions de culture normales pour H.s. :

H.salinarum possède une croissance optimale à 37°C, à pression atmosphérique, avec une concentration de NaCl extracellulaire de 4.2M, à pH 7.2, en présence d'oxygène, de luminosité et dont la composition en nutriments est un mélange d'extrait de levure et de peptone [36][24][37].

3.1.3 Les types de stress que peut rencontrer H.s.

Les types de stress que peut rencontrer H.s. dans la nature :

- Dessiccation extrême (évaporation, internalisation dans des cristaux) ou dilution (pluie).
- Baisse ou hausse des températures.
- Radiation UV excessive ou obscurité totale.
- Anoxie.
- Présence de métaux en abondance ou autre toxine.
- Carence nutritionnelle.

Cet organisme est résistant à de nombreux types de stress [38][39], sa limite de tolérance à chaque type de stress [36][24][37] est :

- Dessiccation : présence de ces organismes dans des cristaux de sel (5.2M).
- Dilution : peut supporter une chute brutale jusqu'à 2.5M de NaCl extracellulaire, en dessous de 1.5M toute les cellules sont lysées.
- Limite basse en température : les cellules entrent en latence à partir de 15°C, une exposition prolongée à des températures de l'ordre de 4°C déstabilise le génome.

- Limite haute en température : peut supporter une température de 50°C, au dessus de 80°C les cellules meurent en moins d'une heure.
- UV : Tolérance très élevée : viabilité de 100% à 100 J/m^2 pendant 1 heure (intensité suffisante pour tuer un organisme tel que *E.coli*). La viabilité chute à 80% pour une exposition à 200 J/m^2 pendant 1 heure.
- Obscurité : totale pendant plusieurs jours.
- Anoxie : totale.
- Tolérance à la carence nutritionnelle : les phases stationnaires durent plusieurs semaines.

Cet organisme est parfait pour étudier la réponse aux stress, du fait de sa grande gamme de tolérance aux stress. Nous utilisons au laboratoire la souche NRC-1.

Chapitre 4

L'organisme *Haloferax volcanii* (Hv)

Haloferax volcanii (Hv), tout comme *H. salinarum* (Hs) est une archée de la famille des Halobacteriaceae (Phylum Euryarchaeota, Classe Halobacteria, Ordre Halobacteriales, Famille Halobacteriaceae). Son habitat d'origine est la mer morte mais on la retrouve aussi dans les grands lacs salés. Cet organisme a été découvert par Mulla-khanbhai et Larsen en 1975 [40].

Les cellules Hv sont extrêmement pléomorphes, de couleur rouge orangé clair, souvent en forme de disque de 0,4-3 x 2-3 micromètre (les cellules peuvent avoir une forme ronde, carrée, ovale, rectangulaire ou en forme de "corn flakes"). Cet organisme est non mobile. Cette archée se développe dans des milieux contenant une concentration en chlorure de sodium comprise entre 60 et 260g/L (optimum à environ 110g/L). Tout comme Hs, cet organisme se lyse dans l'eau distillée.

Sa couleur orange est due à la production et à l'accumulation de caroténoïdes pour la protection contre les UV.

Nous utilisons la souche DS2 au laboratoire (que nous nommerons "souche sauvage") et le mutant CN5 issue de la souche H53 (CN5 = H53 Δtet : *trpA*) elle-même issue de la souche DS2 (H53 = DS2 pHV2⁻ $\Delta pyrE2$ $\Delta trpA$).

Chapitre 5

La protéolyse intracellulaire

Une partie du travail effectué pendant la thèse s'est porté sur l'étude de la protéolyse intracellulaire chez les archées halophiles et en particulier sur le rôle *invivo* de la protéase TET.

Les cellules possèdent à la fois des voies de dégradation des protéines extracellulaires et intracellulaires. La principale voie extracellulaire est un système de protéases digestives (endoprotéases, exopeptidases et peptidases) qui digèrent les protéines en oligopeptides, qui pourront passer la membrane des cellules par le biais de transporteurs, afin de générer un pool de petits peptides pour le métabolisme cellulaire. La cellule possède également plusieurs voies protéolytiques intracellulaires pour dégrader les protéines. Ces voies protéolytiques peuvent être classées en deux grands systèmes : les lysosomes et les voies cytosoliques dont la principale est la voie ubiquitine/protéasome.

5.1 Les fonctions

5.1.1 Rôle général de la protéolyse

La protéolyse cytosolique ou dégradation des protéines est l'un des processus les plus essentiels à la survie de la cellule. Elle assure l'élimination des protéines défectueuses,

des protéines mal repliées [41], mais aussi contrôle la demi-vie de certaines protéines et joue donc un rôle dans les processus métaboliques. Les acteurs de la protéolyse sont des protéines appelées "protéases" dont le rôle est de dégrader en acides aminés les protéines ciblées.

Les protéases ne dégradent pas n'importe quelles protéines. La dégradation est spécifique et cette spécificité est assurée par les signaux de dégradation. Les signaux de dégradation se classent en deux catégories : les signaux de dégradation primaires qui sont essentiellement situés au sein de la structure elle-même. Ce sont généralement des régions hydrophobes non structurées ou des motifs de quelques acides aminés localisés en N-terminal ou en C-terminal ou dans des localisations variables à l'intérieur de la séquence [42].

Les signaux de dégradation secondaires sont apportés en trans sur les protéines. Ce sont des modifications post-traductionnelles qui peuvent être des phosphorylations ou l'addition co-traductionnelle de signaux peptidiques. Ces modifications permettent la régulation fine et spécifique de l'activité de la protéolyse (ex. système ubiquitine voir la suite).

On peut définir quatre grandes fonctions protéolytiques.

1. La protéolyse joue un rôle important dans la régulation des processus cellulaires [43] [44] en contrôlant précisément la demi-vie de nombreux facteurs de régulation [41]. Le processus est hautement sélectif et finement régulé et la demi-vie d'une protéine donnée varie selon sa fonction, de quelques minutes à quelques jours. En contrôlant le niveau de protéines-clefs dans la cellule, la protéolyse intervient dans la régulation du cycle cellulaire ; de l'oncogenèse ; de la transcription ; du développement et la croissance ; de l'atrophie des muscles et de la présentation de peptides antigéniques [45] [46] [47].

2. Il existe un système de contrôle de la qualité des protéines [41] dont le but est de prévenir l'accumulation des protéines défectueuses dans la cellule [48] [49].

Des protéines défectueuses peuvent provenir de diverses origines :

- d'erreurs de la machinerie de la traduction, qui produisent des protéines défectueuses appelées également DRiPs (pour Deficient Ribosomal Products).
- de mutations, qui génèrent des protéines incapables de se replier correctement.
- de détérioration lors de stress environnementaux.

Ce dernier facteur de détérioration est particulièrement présent pour les organismes extrêmophiles.

3. La protéolyse permet à la cellule d'éliminer les protéines et les peptides superflus afin de générer un pool d'acides aminés pour la synthèse de nouvelles protéines.
4. Enfin, la dégradation de peptides cytosoliques, à deux fins : pour la régulation des peptides cellulaires et extracellulaires comme par exemple par l'activation du complexe majeur d'histocompatibilité ; ou pour le métabolisme en dégradant des peptides cellulaires (autophagie) et extracellulaires, afin de générer des acides aminés pour le fonctionnement du métabolisme cellulaire lors de carences nutritionnelles.

Les protéases sont largement représentées dans la cellule (3 à 10% des protéines de la cellule) et se répartissent en deux groupes selon leurs besoins énergétiques. On distingue les protéases ATP-dépendantes et les protéases ATP-indépendantes.

Les protéases ATP-dépendantes interviennent essentiellement dans la dégradation des protéines dites régulatrices et dans l'élimination des protéines défectueuses. L'inhibition ou l'inactivation de la majorité des protéases ATP-dépendantes entraîne une sensibilité aux stress et l'accumulation des protéines défectueuses dans le cytoplasme. La majorité de ces protéases sont induites en conditions de stress [41].

Les protéases ATP-indépendantes interviennent notamment dans les fonctions dites de

”ménage”. Leur rôle est notamment de réaliser l’étape finale de la protéolyse *in vivo*, en ce sens elles sont chargées de dégrader les petits oligopeptides, issus de la protéolyse dépendante de l’énergie, en acides aminés réutilisables.

5.1.2 Rôle de la protéolyse dans l’extrémophilie des halophiles

Les extrémophiles sont constamment soumis à de multiples stress environnementaux, ce qui engendre de nombreuses détériorations des protéines et de l’ADN. L’accumulation de protéines défectueuses dans le cytoplasme est un facteur de toxicité important pour les cellules. Une des réponses cellulaires au stress est l’induction rapide et temporaire de la machinerie protéolytique. Il faut donc une machinerie efficace et complète pour réagir face à des protéines à dégrader en masse. La protéolyse cellulaire joue donc un rôle clé dans la survie de ces organismes extrémophiles, en éliminant le surplus de protéines non fonctionnelles et ainsi en évitant une nécrose due à une trop grande concentration de protéines toxiques.

5.2 Les acteurs

5.2.1 Les Principaux acteurs eucaryotes pour la dégradation des protéines solubles

Les protéines solubles intracellulaires sont en général dégradées par des protéases solubles classées en quatre types majeurs, basés sur la nature du ou des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse et leurs mécanismes d’action :

- Les protéases à sérine qui possèdent une triade catalytique caractéristique comprennent une sérine, une histidine et un aspartate. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique.

Exemples : la thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine lors de la coagulation sanguine, mais aussi la trypsine et la chymotrypsine qui sont des enzymes digestives du suc pancréatique.

- Les protéases à thiol qui possèdent une cystéine dans leur site actif. Dans ces protéases, le rôle du nucléophile est joué par le soufre de la cystéine, sous forme de thiolate déprotoné. Exemples : les caspases qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation.
- Les protéases acides agissant à pH acide et possédant un acide aspartique sur leur site actif. Exemple : la pepsine endoprotéase digestive du suc gastrique.
- Les métalloprotéases qui possèdent un ou plusieurs cations métalliques, en général un atome de zinc, fixé fortement à la protéine par les chaînes latérales de plusieurs acides aminés. Le cation métallique intervient directement pour activer une molécule d'eau qui clive la chaîne peptidique. Exemple : les protéases de la matrice extracellulaire comme les collagénases.
- Les protéines solubles intracellulaires peuvent être également dégradées par la voie ubiquitine/protéasome si elles sont reconnues comme incorrectement repliées ou non assemblées par le système de contrôle de qualité. Ce système ayant un rôle majeur, sa description fait l'objet du chapitre suivant.

La voie ubiquitine/protéasome est responsable de la dégradation de la grande majorité des protéines en particulier les protéines anormales, résultant de défauts de synthèse ou de modifications perturbant leur repliement tridimensionnel et par conséquent leur fonctionnement. Le ciblage des protéines incorrectement repliées vers la voie ubiquitine/protéasome depuis le Réticulum Endoplasmique (RE) se fait par deux systèmes successifs : un système de contrôle de qualité et un système de dégradation. Ces

mécanismes font intervenir de nombreuses protéines chaperonnes et enzymes.

Le système contrôle qualité du réticulum endoplasmique (Endoplasmic Reticulum Quality Control = ERQC) joue un rôle essentiel dans le repliement et la maturation des protéines nouvellement synthétisées. Il fournit un environnement optimal pour le repliement, l'oxydation et l'assemblage des oligomères des protéines transloquées dans la lumière du RE ou insérées dans la membrane. Le repliement dans le RE se fait par l'action combinée de nombreuses enzymes de repliement, de chaperonnes moléculaires et de senseurs de repliement [50]. Ces dernières s'associent pour la plupart à la chaîne polypeptidique naissante et aident au repliement tant que la protéine n'a pas acquis son état natif. Afin d'assurer un processus de maturation correct, la sortie du RE est régulée par le système de contrôle qualité du RE qui prévient la sécrétion des protéines mal repliées [51].

Les protéines de conformations incorrectes produites dans le RE sont pas transportées le long de la voie sécrétrice, mais sont retenues dans le RE où elles sont soit prises en charge par les chaperonnes pour acquérir une conformation correcte, soit dirigées vers l'ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation) [51]. Les protéines mal repliées ou non assemblées sont reconnues par ces chaperonnes. Elles sont ensuite retransloquées dans le cytoplasme, déglycosylées et polyubiquitinylées avant d'être dégradées par le protéasome.

Il arrive qu'un certain nombre de protéines déficientes arrivent à passer tous les contrôles précédents et se retrouvent au niveau de la membrane plasmique. A ce niveau là, ces protéines (ainsi que les autres protéines devenues déficientes ou obsolètes) sont dégradées majoritairement par la voie lysosomale. Il existe quatre différents types d'acheminement, vers les lysosomes, des molécules à dégrader : l'endocytose, la pinocytose, la phagocytose et l'autophagie.

Le terme lysosome (du grec *lusi* "séparer" et *soma* "corps") évoque la grande quantité d'enzymes de lyse contenues dans cet organite. Les lysosomes sont des organites cellulaires de 0,2 à 0,5 microns formés dans l'appareil de Golgi et présents dans le cy-

tosol. L'activité du lysosome a un rôle majeur lors de l'hétérophagique (décomposition des corps étrangers), lors de l'autophagique (dégradation d'une partie du cytoplasme par ses propres lysosomes), lors des remaniements tissulaires (activité principale au niveau des reins avec la suppression progressive des ébauches), lors de la détoxication (activité principale au niveau du foie avec le stockage des sels biliaires nocifs pour la cellule) et enfin lors de la régulation de la sécrétion hormonale de la cellule. Cet organite ne contient pas seulement des protéases, il présente aussi abondamment des lipases, des glycolipases, des nucléases, des phosphatases, des sulphatases, des phospholipases, c'est un véritable organite de digestion de macromolécules endogènes ou exogènes. Les enzymes lysosomales (cathepsines, ...) sont dépendantes de l'acidité du milieu car elles sont actives à pH5 (lysosome), mais inactives à pH7,2 (cytosol). L'acidité des lysosomes est due à la présence d'une pompe à proton ($H^+/ATPase$), qui crée un gradient de protons entre les lysosomes et le cytosol.

La voie ubiquitine-protéasome

Le système protéasome est utilisé aussi bien par les archées, que par les levures, les plantes ou les animaux. Le système principal d'adressage des protéines au protéasome est appelé "système ubiquitine". Ce type d'adressage n'est utilisé que par les eucaryotes [52].

La voie protéolytique utilisant l'ubiquitine et le protéasome fonctionne en deux grandes étapes : dans un premier temps, le substrat à dégrader est marqué par addition d'une chaîne de polyubiquitine ; dans un deuxième temps, le substrat polyubiquitinylé est reconnu et dégradé par le protéasome 26S. Il est à noter que d'autres voies de signalisation comme les signaux N-Ter ou des voies de signalisation ubiquitine-indépendante existent et permettent l'adressage des protéines à dégrader.

L'ubiquitination :

Cette voie de dégradation utilise l'ubiquitine, un polypeptide de 76 amino-acides (poids

moléculaire 8,4kDa), pour marquer les protéines à dégrader [53]. Ce marquage se fait par l'attachement covalent de l'ubiquitine à un résidu lysine du substrat, par une cascade enzymatique nécessitant l'action de trois enzymes, appelées E1, E2 et E3. A ce jour chez l'Homme un seul gène a été identifié pour E1 (ubiquitin activating enzyme), plusieurs pour E2 (ubiquitin-carrier protein) et à peu près 300 pour E3 (ubiquitin-protein ligase). Dans la plupart des cas, E3 se comporte comme un récepteur, qui sélectionne et présente à E2 la protéine à détruire. Les nombreuses formes d'E3 ont chacune une affinité spécifique pour une gamme de protéines. La procédure d'ubiquitination est la suivante : d'abord, en présence d'ATP l'ubiquitine réagit avec E1, formant ainsi un thiolester entre sa glycine C-terminale et un résidu cystéine d'E1. L'ubiquitine est ensuite transférée sur E2, réalisant une liaison instable avec une cystéine. Enfin, l'ubiquitine est transférée sur une lysine du substrat par E3. Cette réaction de conjugaison de l'ubiquitine a lieu plusieurs fois, l'ubiquitine étant conjuguée à elle-même (au niveau de la lysine 48), ce qui se traduit par l'addition sur le substrat d'une chaîne d'ubiquitines qui sert de signal de dégradation (une chaîne doit être composée d'au moins quatre molécules pour être reconnue comme un signal).

Le protéasome 26S :

Les protéines ubiquitinées sont ensuite reconnues par le protéasome, grand complexe qui possède une activité endopeptidasique. Le terme "protéasome" a été forgé par analogie avec le terme ribosome qui est l'organe responsable de la fonction inverse (production de protéine), avec lequel il rivalise en taille. Ce complexe, vital pour les cellules, est formé par le protéasome 20S qui constitue son cœur protéolytique et deux molécules de PA700 (ou complexe régulateur 19S), qui s'associent aux extrémités du protéasome 20S [54]. Cette association est ATP dépendante. Le protéasome 26S dégrade les protéines ubiquitinylées en petits peptides de 3 à 24 résidus.

Le protéasome 20S :

Le protéasome 20S compose le cœur peptidasique du protéasome, c'est un cylindre

creux formé de 4 anneaux heptamériques. Chaque anneau est constitué de sous-unités de petite taille alpha ou beta (20 à 35kDa). Le complexe moléculaire est composé de 28 sous-unités : chacun des deux anneaux externes étant constitué par sept sous-unités "alpha" et chacun des deux anneaux internes par sept sous-unités "beta" [55]. Chez les eucaryotes les sept unités alpha et beta sont différentes. Plusieurs activités peptidasiques ont été identifiées à l'aide de substrats peptidiques pour le protéasome 20S [55]. Avec une activité peptidasique ciblant un site précis de coupure après des résidus acides pour beta 1 (caspase-like [?], après des résidus basiques pour beta 2 (trypsin-like [?]) et après des résidus hydrophobes pour beta 5 (chymotrypsin-like [?]), l'ensemble permet la dégradation d'une large gamme de protéines.

Le complexe 19S (PA700) :

PA700 comprend 20 composants protéiques au minimum [56], appelés Rpn's et Rpt's (Rpt est l'acronyme de Regulatory Particle ATPase, Rpn est l'acronyme de Regulatory Particle Non-ATPase) [57][58]. Il est divisé en deux parties :

- La base qui s'associe à la particule 20S et qui est constituée de triple A ATPases (ATPase Associated with various Cellular Activities ou AAA+ [59][60]) et de non-ATPases.
- Le couvercle qui est composé de non-ATPases. Ce "chapeau" plus flexible sert de couvercle à l'entrée dans le site catalytique [61].

L'unité régulatrice PA700 a quatre rôles : dans un premier temps, elle fixe le substrat ubiquitiné (récepteur) ; puis elle dé-ubiquitine la protéine par l'action d'une isopeptidase (les ubiquitines sont recyclées) ; ensuite elle facilite le dépliage et la translocation vers le cœur du protéasome de la chaîne polypeptidique par son activité ATPasique ; et enfin elle active le protéasome par ouverture du pore formé par les sept sous-unités alpha. Ainsi la fixation d'une unité régulatrice au complexe 20S permet l'accès à la chambre catalytique. Par ce mécanisme, la cellule est capable de limiter la dégradation protéique non sélective.

5.2.2 Les principaux acteurs bactériens

Chez les bactéries, il existe plusieurs classes de protéases ATP-dépendantes. Ces protéases incluent : le système ClpAP, le système ClpXP, la protéase ClpYQ qui s'apparente au système protéasome par son mode de clivage [62].

Le système Clp est formé par l'agencement de deux anneaux heptamériques (ClpP), similaire au protéasome 20S. Le complexe protéolytique par lui-même a une activité peptidasique limitée et a besoin pour dégrader des protéines natives d'interagir avec une autre machinerie capable de reconnaître les protéines, de les déplier afin qu'elles soient accessibles aux sites catalytiques. Ces machines se présentent sous forme de complexes ATPasiques (ClpA, ClpX) qui s'associent aux complexes protéolytiques afin de réguler leur activité (comparable au protéasome 19S). Les domaines ou sous-unités ATPasiques sont les régulateurs de l'activité protéolytique portant des activités de type chaperonne moléculaire. Elles appartiennent à la famille de triple A ATPases (AAA+) qui utilisent l'énergie de l'ATP pour réaliser des fonctions de dépliement et de désassemblage ([63]. Tout comme le protéasome, le système Clp doit être conjugué à un système d'adressage des protéines. Chez les bactéries, il en existe de plusieurs sortes, l'un d'eux est le système ssrA qui cible les polypeptides issus d'une traduction défectueuse. Les protéines défectueuses au niveau des ribosomes sont reconnues par les protéases grâce à une séquence peptide "AAANDENYALAA" dans leur région C-terminale.

Certains substrats nécessitent, pour leurs interactions avec les complexes AAA+, la présence d'autres protéines nommées protéines adaptatrices/chaperonnes [64]. Les protéines adaptatrices forment une nouvelle classe de protéines qui ont pour fonction de moduler la liaison du substrat à la protéine AAA+, mais elles sont capables aussi de moduler l'activité des protéines AAA+. Les mieux caractérisés sont les protéines adaptatrices du système Clp : ClpS, RssB, SspB, UmuD, MecA. Les protéines adaptatrices sont des protéines de faible poids moléculaire, qui interagissent directement avec le domaine N-terminal des AAA+.

La plupart des substrats du système Clp (par comparaison au système protéasome)

sont des protéines clefs impliquées dans les processus régulateurs dans la cellule. Le rôle du système protéolytique Clp est de réajuster la composition du protéome [55].

5.2.3 Les principaux acteurs archéens

Les archées possèdent un système protéasome [?] similaire à celui eucaryote, mais simplifié [65]. Ils sont de structure similaire : 4 anneaux formés de sous-unités α et β . La différence de complexité se trouve dans la variété de ces sous-unités.

Comme vu précédemment, le protéasome eucaryote possède 7 types de sous-unités α et 7 de type β . Par contre, la majorité des archées dispose d'un protéasome 20S formé de seulement 2 sous-unités différentes (une de type α et une de type β). Quelques archées possèdent 3 à 4 sous-unités différentes. Par exemple, *Haloferax volcanii* possède 2 sous-unités α différentes et 1 β ; *Haloarcula marismortui* possède 2 α et 2 β ; *Pyrococcus horikoshii* possède 1 α et 2 β . Tout comme le système eucaryote, le système protéasome archéen nécessite un système d'adressage et de ciblage. Le Rôle du complexe 19S est rempli par le système PAN (Proteasome Activating Nucleotidase)[66].

Cette protéine présente de fortes homologues (autour de 40%) avec les sous-unités ATPasiques du protéasome eucaryote (rpt). PAN forme un complexe oligomérique de haut poids moléculaire (550 - 650Kda) sous forme d'anneaux hexamériques.[66]. On peut noter que seules les archées halophiles et les méthanosarcinacées possèdent deux PANs et que certaines archées comme les familles thermoplasmiales et les ferropasmiales ne possèdent pas de séquences codant pour la protéine PAN (ce système n'est donc pas universel dans le monde des archées et est remplacé par une protéine homologue nommée VAT)[67].

PAN peut jouer différents rôles [68] : un rôle de chaperonne moléculaire (permet le repliement de certaines protéines), un rôle d'adressage des protéines au protéasome (dépliage des protéines à dégrader) et un rôle de régulation de l'activité du protéasome (contrôle de l'ouverture / fermeture du pore d'entrée) [69] [68] [70]. Pour l'instant aucune interaction stable entre PAN et le protéasome n'a été démontrée. Il a par contre

été proposé, via des études biochimiques, que le complexe PAN lie le protéasome via son domaine C-terminal [71].

L'ubiquitination n'existe pas chez les archées et aucun mécanisme équivalent n'a été démontré à ce jour. Des protéines homologues à l'ubiquitine existent chez les archées, mais celles-ci sont peu conservées et sont encore mal comprises.

Le rôle d'adressage chez les archées pourrait être endossé par le système SAMP (Pour Small Archaeal Modifier Proteins) [72].

Récemment, il a été montré *in vivo* chez *Haloferax volcanii* que deux homologues de l'ubiquitine, SAMP1 et SAMP2, forment des complexes avec des protéines susceptibles d'être à dégrader [72]. Ces SAMPs sont de petites protéines (autour de 20kDA) qui présentent peu d'homologie de séquence avec l'ubiquitine, sauf un motif C-terminal conservé (le motif est : glycine-glycine). Ces 2 SAMPs peuvent faire une liaison isopeptidique (liaison peptidique qui ne se trouve pas dans la chaîne principale de la protéine) avec les résidus lysine d'une protéine cible. On parle alors de SAMPylation. Ce produit final (protéine cible +SAMP) pourrait être une voie d'adressage à la protéolyse analogue à l'ubiquitination. Toutefois, un lien direct entre la dégradation par le protéasome et la SAMPylation n'a pas encore été établi. Un récapitulatif des rôles de la protéolyse cytoplasmique, ainsi que la position des acteurs principaux de cette protéolyse est représenté sur la figure 5.1.

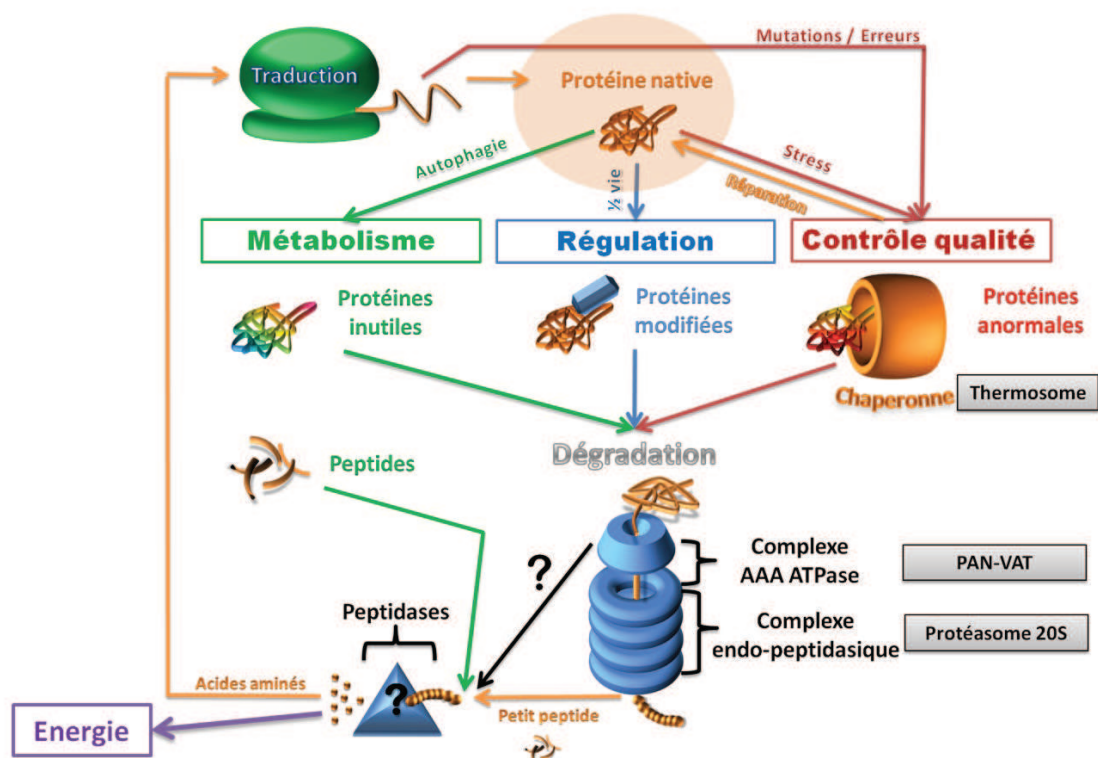


FIGURE 5.1 – Schéma récapitulatif des différents rôles de la protéolyse cytoplasmique chez les archées et position du système PAN-protéasome. Après leurs productions par l'appareil traductionnel, certaines protéines anormales (due à des mutations ou a des erreurs de traduction) Vont être prise en charge par le système contrôle qualité (en rouge) afin d'être dégradées ou réparées. Le contrôle qualité intervient aussi sur des protéines native ayant subit des dégradations lors de stress. Les deux autres rôle de la protéolyse sont la régulation de la demi-vie des protéines(en bleu) et la destruction de protéines inutiles par autophagie pour le métabolisme (en vert). Le système principal et le système protéasome composé d'un complexe AAA ATPase (PAN ou VAT chez les archées) et du complexe endo-peptidasique (protéasome 20S). Ce système dégrade les protéines qui lui sont adressées en petits peptides qui vont être à leur tour dégradé en acide aminé par des peptidases.

Chapitre 6

L'aminopeptidase TET

6.1 Les aminopeptidases

En plus du système protéasome, il existe de nombreuses voies alternatives de dégradation des protéines, telle que la protéase Lon, qui se trouve dans les bactéries, les archées [73] [74] et les mitochondries. Il est important de noter que toutes ces machines protéolytiques ne sont pas en mesure d'achever le processus de dégradation, c'est-à-dire de dégrader des protéines en acides aminés simples. Ils génèrent tous un pool d'oligopeptides de longueurs différentes qui ont besoin d'un traitement ultérieur par des peptidases, afin de générer des acides aminés.

Les substrats des aminopeptidases sont des peptides qui proviennent de l'environnement extracellulaire ou qui sont produits par la dégradation des protéines par des machineries ATP dépendantes telles que le protéasome.

De plus, l'élimination des résidus terminaux des chaînes polypeptidiques par les aminopeptidases est nécessaire pour réaliser une large gamme de fonctions biologiques [75]. Dans certains cas, les protéines peuvent être soumises à des modifications N-terminale ou C-terminale. Ces modifications vont permettre la maturation ou l'activation la protéine ou de contrôler la demi-vie de la protéine dans les cellules.

Les aminopeptidases peuvent donc jouer un rôle essentiel pour les fonctions d'en-

tretien et de ménage tels que le renouvellement des protéines ou l'homéostasie des acides aminés, ainsi que pour le contrôle de processus cellulaires telle que la protéolyse spécifique.

Une large gamme de séquences d'aminopeptidase est présente dans le génome des archées [76], dont la majorité sont métallo-dépendantes. On les classe en deux sous-types, chacun ayant ses spécificités :

- Les amino-peptidases de type N : exopeptidases capable de dégrader les oligopeptides (de 2 à 20 acides aminés, avec une activité préférentielle pour la lysine, la leucine et l'arginine).
- Les amino-peptidases de type C : exopeptidases qui ont une activité optimum pour des peptides d'une taille inférieure à 4 acides aminés.

Le premier complexe peptidasique, identifié pour réaliser la dégradation en acides aminés des oligopeptides produits par le protéasome, est le complexe Tricorne. La protéase Tricorne (TRI) est un complexe hexamérique de 720 kDa découvert chez *Thermoplasma acidophilum*. TRI est capable de digérer les peptides produits par le protéasome en tri- ou dipeptides, qui sont à leur tour dégradés de façon séquentielle par de petites aminopeptidases associées à TRI, nommées Tricorn Interacting Factors F1, F2 et F3 [77]. Le complexe TRI est seulement présent dans les génomes de certains procaryotes et l'alignement des séquences primaires ne révèle aucun homologue dans le règne eucaryote. Il existe donc sûrement d'autres grands complexes capables de réaliser cette fonction.

6.2 La protéine TET

En plus du complexe TRI, un autre complexe peptidasique d'archée a été décrit. Ce complexe oligomérique de type inconnu a été découvert chez l'archée *Haloarcula*

marismortui (découverte réalisé dans notre laboratoire) [78]. Cette protéase appartient à la famille peptidase M42 (classification MEROPS) et a été nommé Aminopeptidase tétraédriques (TET) , en référence à la peptidase TRI et en raison de sa structure tridimensionnelle particulière en forme de tétraèdre.

Le complexe protéique a donc une forme de tétraèdre (voir figures 6.1) dont l'arrête fait 150 Å environ. Cette protéase géante est un complexe protéique auto-compartmenté de 12 sous-unités identiques, avec une activité aminopeptidase à large spécificité de substrat et pouvant traiter des peptides d'une longueur de 20 acides aminés[78].



FIGURE 6.1 – **Structure de l'enveloppe du complexe TET de l'archée halophile *H.marismortui***, l'enveloppe a été déterminée par microscopie électronique, la particule est vue sous ses 3 axes de symétrie (d'après Franzetti *et al* 2002 [78]).

L'alignement de séquences primaires a révélé la présence de TET chez la majorité des archées et chez différentes espèces bactériennes. Notre équipe a déterminé les structures et l'enzymologie de 3 différentes protéines TET de l'archée hyper-thermophile *Pyrococcus horikoshii*. Ce travail montre que ces complexes possèdent des activités aminopeptidasiques complémentaires avec une spécificité de substrats différentes, qui leur permettent de dégrader complètement tout type de polypeptide à partir de leur extrémité N-terminale. La peptidase TET1 de *Pyrococcus horikoshii* (nommé PhTET1) a été particulièrement bien décrite [79] [80] [81].

Cette peptidase d'organisme hyper-thermophile a une activité amino-peptidasique optimale à 90°C, avec un pH autour de 7,4 et en présence du cofacteur métallique cobalt.

La structure de la peptidase PhTET1 a été réalisée par cristallographie au rayon X et a permis d'observer deux ions cobalt par site catalytique (ce métal était présent à forte

proportion dans les solutions de cristallisation). Le monomère PhTET1 contient 332 résidus et a un poids moléculaire d'environ 37 kDa. Les dimères de PhTET1 peuvent s'assembler en deux différentes structures quaternaires : un tétraèdre dodécamérique et un octaèdre tétracosamérique, ces deux formes ont pu être observées par microscopie électronique (voir figure 6.2) [79]. Il est à noter que ces deux types de formes n'ont été observées que pour PhTET1 et non pour la TET de *Haloarcula marismortui* et les autres TET de *Pyrococcus horikoshii*, en effet pour ces autres TET seule la forme à 12 sous-unités a été observée.

Cette capacité d'assemblage sous deux formes quaternaires avait déjà été identifiée auparavant pour des capsides virales et est rendu possible grâce à des interactions quasi-équivalentes entre les sous-unités protéiques (voir figure 6.3) [79].

Pour passer de la structure du dimère de la forme 12ss à celle de la forme 24ss, une simple inclinaison de 14° entre les deux monomère est nécessaire. Ces rotations ont des conséquences sur les structures quaternaires des complexes. Cette modification change la géométrie de la particule, pour le complexe quaternaire à 12ss chaque sommet du tétraèdre est constitué de 3 sous-unités, pour le complexe quaternaire à 24ss chaque "pointe" du octaèdre est constitué de 4 sous-unités. A cause des géométries particulières adaptées par ces deux types de complexes quaternaires, les réseaux de cavités internes ont des tailles différentes, étant de taille plus importante pour les complexes à 24ss [79]. Le complexe à 24 sous-unités étant présent que pour une des TET de *Pyrococcus horikoshii*, nous ne focaliseront pas sur sa description.

L'organisation interne des particules PhTET1 à 12ss révèle une auto-compartimentation permettant la formation de réseaux de canaux amenant à de vastes chambres catalytiques (voir figure 6.4).

L'examen du réseau interne du complexe 12ss révèle une compartimentation complexe de PhTET1. Les quatre grandes ouvertures situées dans chaque face du tétraèdre

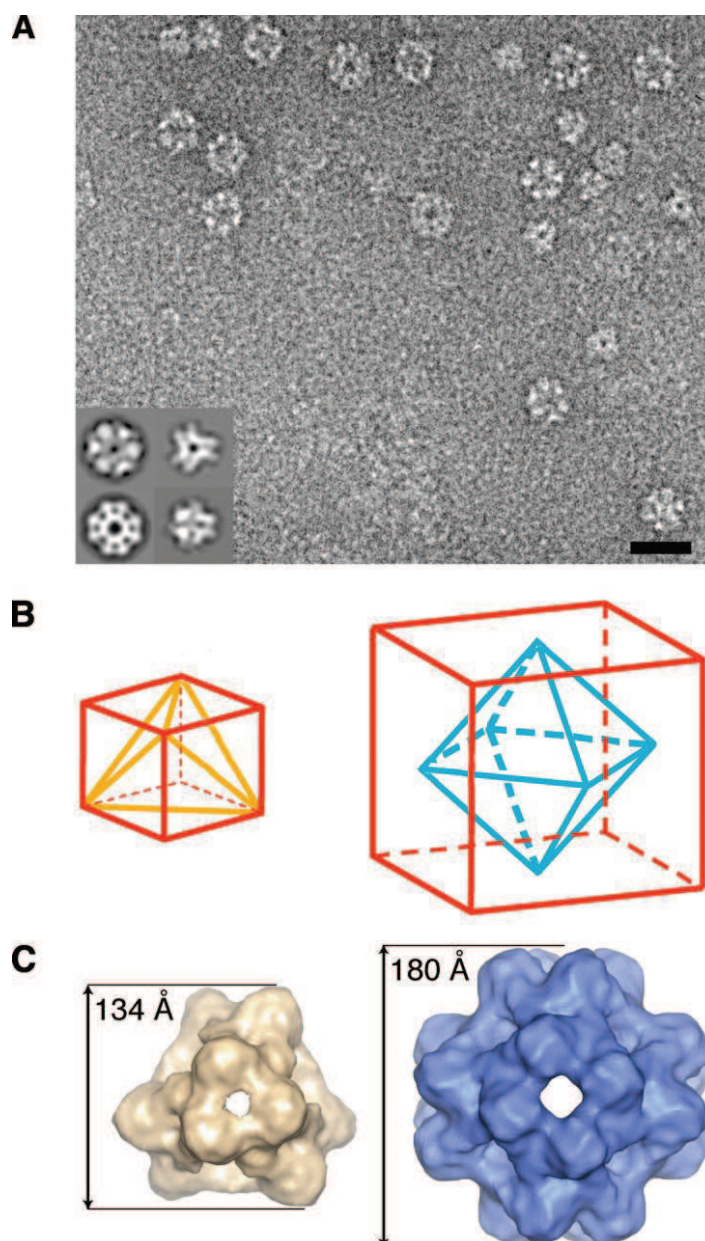


FIGURE 6.2 – **Microscopie électronique de PhTET1.** **A.** Image obtenue par microscopie électronique à coloration négative de PhTET1 montrant les deux structures de phTET1. [79] **B.** Vues schématiques d'un tétraèdre et d'un octaèdre inscrits dans un cube. **C.** A gauche, reconstruction tridimensionnelle de la structure de PhTET1 de 12 sous-unités à 14 Å de résolution. A droite, reconstruction tridimensionnelle de la structure de PhTET1 24 sous-unités à 15 Å de résolution.

donnent accès à quatre larges canaux qui se croisent au milieu de la particule. La dimension des canaux est comparable à celles trouvées dans d'autres grandes peptidases

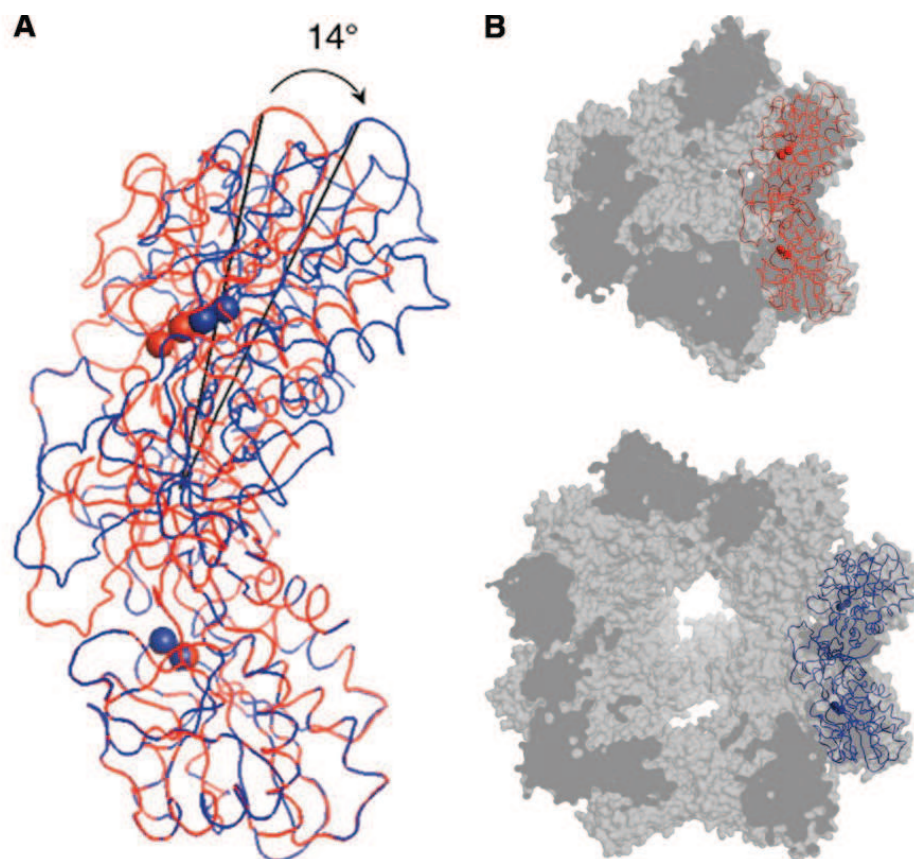


FIGURE 6.3 – Structure du dimère dans les deux complexes (12ss et 24ss) de PhTET1 [79]. Une représentation du dimère extrait du modèle tétraédrique de PhTET1 en bleu superposé à un dimère extrait du modèle octaédrique de PhTET1 en rouge. Les ions cobalt sont présentés comme des sphères. Pour visualiser le changement de forme permettant d'intégrer les dimères dans chaque structure, les monomères en bas de chaque dimère ont été superposés, afin de visualiser les déformations nécessaires du dimère pour passer d'une structure de 12ss à 24ss. **B.** Intégration des deux structures dimériques de A. dans les deux complexes possible de PhTET1.

cytosoliques. Le potentiel de surface électrostatique présent dans les canaux suggère que ces derniers sont impliqués dans la navigation et l'orientation du substrat peptidique vers les chambres catalytiques [79].

Quatre sous-compartiments en forme d'entonnoir sont ensuite présents dans les sommets du complexe, c'est à ce niveau que sont situées les chambres catalytiques contenant chacune trois sites actifs. Dans le cas de PhTET1, les chambres catalytiques sont chargées positivement à l'exception des sites actifs. En raison de la répulsion

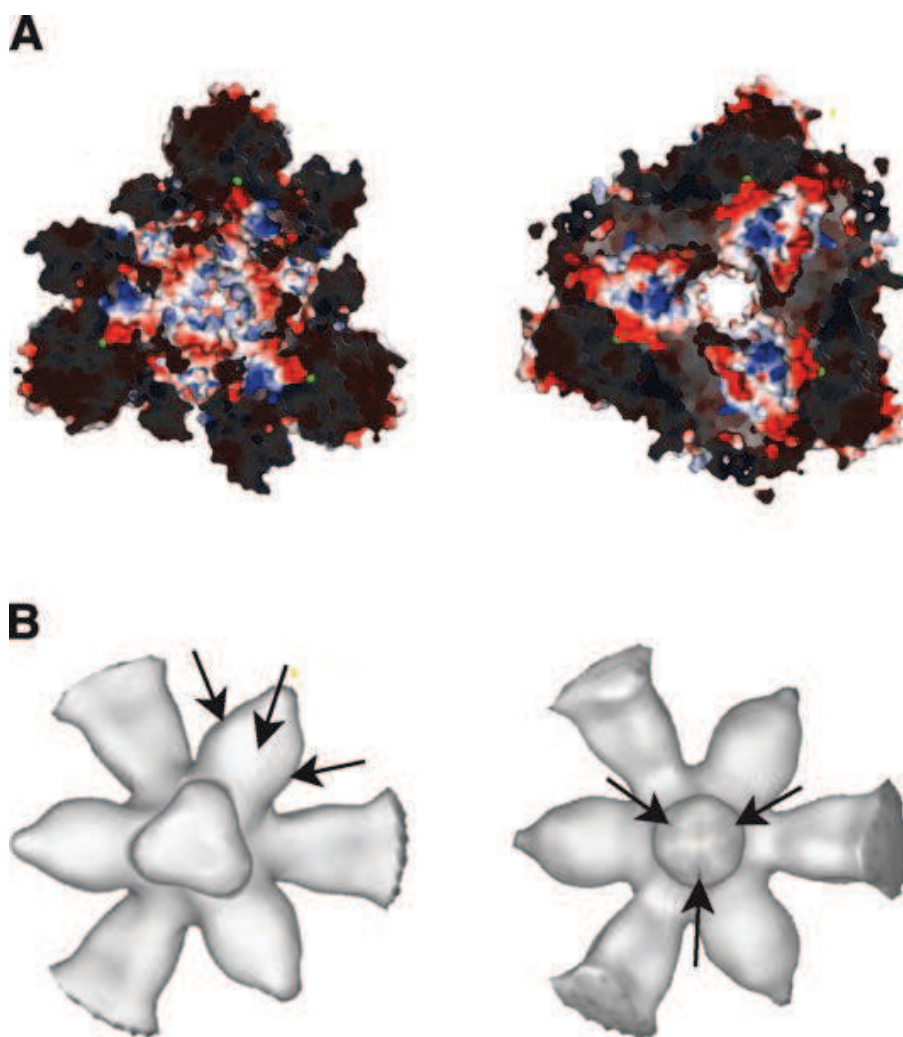


FIGURE 6.4 – **Structures internes du complexe de PhTET1 à 12 sous-unités.** [79] **En haut**, coupe de la structure quasi-atomique du complexe PhTET1 sous deux orientation différentes. **En bas**, moulage des cavités du complexe à 12 sous-unités, l'orientation des structures correspond à la même que celle des images d'en-dessus. Les flèches indiquent la position des sites catalytiques.

électrostatique, une fois que le polypeptide pénètre dans la chambre catalytique, leurs résidus N-ter doivent être détournés vers l'un des trois sites actifs [79].

Enfin, à l'extrémité de ces quatre chambres catalytiques est présente une ouverture vers l'extérieur, plus étroite que les ouvertures des faces du tétraèdre. Ces pores présents dans les sommets du tétraèdre ne sont pas assez larges pour permettre le passage aisé d'un peptide étendu. En conséquence, ces orifices paraissent plus adaptés pour l'expul-

sion des acides aminés libres générés par la réaction aminopeptidase [79].

Il en ressort un mécanisme présomptif. Entrée et guidage de la chaîne polypeptidique par un des 4 pores (20 Å de diamètre) situés dans une des faces du tétraèdre. Puis, l'adressage par une boucle mobile de l'extrémité N-ter vers une des 4 poches catalytiques est réalisée au niveau du croisement des 4 systèmes de guidage. Entrée du peptide dans la chambre catalytique, puis clivage des acides aminés N-ter par un des 3 sites actifs de la poche. Enfin, l'expulsion des acides aminés est réalisée par l'orifice situé aux pointes du tétraèdre [79].

La place des complexes TET dans la protéolyse intracellulaire n'est pas encore connue.

Le système TET pourrait jouer un rôle homologue à celui proposé pour la protéase Tricorne, c'est-à-dire que TET pourrait fonctionner en aval du protéasome pour achever le travail de dégradation des protéines. Mais ce n'est pas le seul rôle potentiel pour cette protéase : de par son activité peptidase à large spectre, TET pourrait aussi jouer un rôle important dans le métabolisme en permettant l'hydrolyse de peptides extracellulaires importés par des transporteurs. De plus, l'activité amino-peptidase de TET pourrait également participer à la maturation post-traductionnelle et à l'adressage de certaines classes de protéines. Enfin, l'analyse structurale des complexes TET ainsi que des expériences de co-purification (réalisées au laboratoire) indiquent que TET pourrait interagir avec d'autres grands complexes régulateurs (complexe protéasome, complexes de protéines chaperonnes, polysomes, ...) et ainsi constituer un nouveau système de dégradation, destiné à remplir des fonctions similaires à celles du protéasome ou plus spécialisées.

Il est à noter que l'organisme *H.salinarum* possède seulement 1 gène pour la protéine TET et l'organisme *H.volcanii* en possède quant à lui 2 différents.

Chapitre 7

Objectifs de la thèse

Les systèmes moléculaires décrits chez les archées mettent en évidence une simplicité, comparativement à leurs homologues eucaryotes. Par ailleurs, leur caractère extrêmophile a pour conséquence une hyper-robustesse qui rend leur manipulation *in vitro* et les études structurales beaucoup plus aisées. Ainsi les archées représentent de bons modèles pour comprendre les fonctions cellulaires complexes, particulièrement celles qui mettent en jeu de grandes machineries moléculaires, comme celles impliquées dans la protéolyse.

Mon premier objectif de travail de thèse a été de comprendre les mécanismes de résistance dans l'adaptation des archées halophiles aux stress environnementaux. Les archées halophiles accumulent des concentrations multi-molaires de KCl/NaCl dans leur cytosol (3.4M KCl / 1.1M NaCl chez *Halobacterium salinarum*). Cette situation suppose une biochimie très particulière qui autorise un fonctionnement dans des solvants où l'eau libre est rare. Ainsi, les protéines de ces organismes sont elles-mêmes halophiles et ne sont solubles et repliées que dans des conditions de salinité extrêmes (de 2 à 5M sel). Cette biochimie particulière expliquerait en partie l'extraordinaire capacité des archées halophiles à résister aux stress physico-chimiques (température, radiations, déshydratation). Le matériel d'étude utilisé est l'archée halophile stricte *Halobacterium salinarum*.

Nous voulions étudier la réponse de cet organisme à des stress de basse salinité. En effet, au-delà du choc osmotique, la chute de la concentration saline dans le milieu provoque une baisse de la concentration en KCl intracellulaire (ref), ce qui doit avoir un effet direct sur l'état de repliement des protéines intracellulaires, comme lors d'un stress thermique. Très peu de données sur la réponse des cellules halophiles extrêmes à une baisse de salinité dans l'environnement étaient connues.

Dans la première partie de cette thèse, j'ai réalisé une étude visant à déterminer les limites de viabilité et les modifications cytosoliques associées à une baisse de salinité. Pour analyser le phénomène nous avons doser les modification de concentration/accumulation du sel intracellulaire conjointement à des mesures de viabilité. Nous avons aussi quantifier l'induction de protéines chaperonnes liées à la réponse au stress. Enfin nous avons réaliser une étude importante de biophysique neutronique afin d'évaluer l'effet du stress sur le repliement des protéines in vivo.

Au cours de ce travail, il a été mis en évidence un phénomène de survie à la basse salinité associé à des modifications morphologiques. Pour d'écrire ce phénomène, une seconde étude à été réalisé en prenant en compte les changement morphologique des cellules des cellules en survie, mais aussi les fluctuations de salinité intracellulaire , ainsi que une étude de la composition globale du protéome au cours de ces stress en condition de basse salinité. Il a été mis en évidence lors d'un stress de basse salinité "progressive" en plus de la survie d'une grande quantité de cellules, des changements morphologiques importants associés à une chute de la concentration intracellulaire en K^+ , ainsi qu'une modification du protéome.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse a consisté mettre en évidence l'importance des systèmes de protéolyse dans l'adaptation des archées halophiles aux stress environnementaux. L'effet d'une faible concentration en sel provoque la dénaturation des protéines halophiles, l'accumulation de protéines mal repliées dans le cytoplasme met à contribution les systèmes chaperons et la machinerie de protéolyse intracellulaire. Dans ce contexte, une partie de mon travail de thèse a été de contribuer à la

compréhension du rôle dans la protéolyse in vivo du système PAN-protéasome, avec un accent sur la croissance, la réponse au stress et l'adaptation halophile. L'autre partie de mon travail de thèse sur la protéolyse a consisté à placer le rôle du complexe protéasique TET découvert au laboratoire dans la physiologie des cellules procaryotes. Cette étude s'est déroulée sur deux archées halophiles différentes : *Halobacterium salinarum* et *Haloferax volcanii*. Nous avons choisi de travailler sur ce deuxième organisme car nous disposions pour celui-ci d'une souche mutante CN5 délétée d'un des gènes TET. Ainsi nous avons étudiés l'accumulation de la protéine TET lors de la croissance et lors de différents stress (thermique/salin/nutritifs) chez *Halobacterium salinarum* et les différences de phénotype entre la souche sauvage et la souche mutante CN5 chez *Haloferax volcanii* lors des différents stress.

Deuxième partie

Détermination des mécanismes
moléculaires permettant la survie
de l'archée halophile *Halobacterium*
salinarum dans des conditions de
basse salinité

Chapitre 8

Effet du sel sur la dynamique in vivo du protéome de *Halobacterium salinarum*

La capacité de développement des micro-organismes dans leur environnement naturel dépend surtout de leurs capacités à surmonter les effets délétères de l'instabilité du repliement des protéines due aux facteurs physico-chimiques extrêmes.

A cette fin, les cellules emploient trois stratégies différentes à divers degrés : l'accumulation de solutés compatibles pour stabiliser les différents composants du cytoplasme (tréhalose, glutamate, bétaïnes, ...); l'induction de machines moléculaires spécialisées dans le contrôle qualité des protéines (protéines chaperonnes et protéases); et la modification structurelle de la protéine elle-même. Le dernier trait se fait par l'évolution adaptative et est souvent favorisée chez les organismes extrémophiles, une classe de microorganisme qui nécessite des températures extrêmes ou des conditions de sel pour vivre. Tous les processus adaptatifs ont en commun le fait qu'ils modifient le paysage énergétique de dynamique moléculaire des protéines.

Dans ce projet, nous souhaitons voir l'influence des perturbations thermiques et salines de l'environnement sur la dynamique du protéome in vivo. Ces expériences sont

réalisées sur l'organisme *Halobacterium salinarum* en conditions de stress modéré direct (2,5M et 2,0M de NaCl extracellulaire), que nous comparons à des stress thermiques. Nous avons choisis des conditions de stress thermiques qui ont un impact similaire sur la croissance des cellules que ceux observés lors des stress hyposalins à 2,5 et 2,0M (soit respectivement 55°C et 60°C).

Halobacterium salinarum (poussant dans des conditions salines optimales proches de 4.2M de NaCl) a adopté une stratégie d'accumulation de sel pour contrebalancer la pression osmotique élevée, imposée par le milieu où il prospère. En effet des mesures de spectrométrie de flamme (par ICP voir chapitre 15.2) nous ont permis de confirmer et de vérifier dans nos conditions expérimentales la teneur en ions salins du cytoplasme : nous avons mesuré une concentration en ion K^+ de 3,7M et en ion Na^+ de 1,1M Na^+ en condition de croissance optimale et en début de phase exponentielle.

Pour mesurer la concentration en sel intracellulaire, des fractions de 1mL de culture sont culottées. Il est important de compter le nombre de cellules présentes dans 1mL de culture, pour remonter à la fin à la concentration intracellulaire d'une cellule. Les cellules culottées sont lavées avec un tampon sans KCl, puis à nouveau culottées sur un coussin de diméthylphtalate. Ces deux étapes de lavage sont réalisées pour éviter de mesurer le sel du milieu environnant et ainsi ne mesurer que le sel intracellulaire. Le culot obtenu est ensuite transféré dans 10mL d' H_2O distillée, le choc osmotique devrait provoquer la lyse des cellules, mais nous effectuons quand même une série de sonications pour achever complètement la lyse. Les échantillons sont ensuite utilisés pour mesurer la concentration en sel grâce à un spectromètre de flamme, préalablement calibré avec une gamme de solution en K^+ et Na^+ . Une fois la valeur de la concentration en sel obtenue, il est nécessaire de remonter les dilutions et ainsi obtenir une concentration en sel par cellule (mol/cellule). Pour obtenir la concentration molaire, une étude du volume moyen des cellules est nécessaire (en moyenne dans cette condition $v = 2,5\mu m^3$, soit $v = 2,5 \times 10^{-15} L$).

Du fait de la forte concentration en sel intracellulaire, il est nécessaire que les

protéines cytosoliques soient adaptées pour rester solubles, stables et fonctionnelles lorsque l'activité de l'eau est faible et dans des milieux extrêmement riches en ions qui normalement entravent les processus biologiques (voir chapitre 2.3).

Dans ce contexte, il est intéressant d'utiliser la spectroscopie de neutrons afin d'évaluer comment l'adaptation moléculaire des protéines halophiles, ainsi que la fluctuation de l'hypersalinité du milieu, affectent les propriétés de dynamique moléculaire du protéome halophile dans le contexte cellulaire.

8.1 Mesure de la dynamique moléculaire des protéines par diffusion de neutrons in vivo

8.1.1 La dynamique moléculaire des protéines

La dynamique moléculaire est la mesure des mouvements atomiques au cours du temps.

Chaque atome d'une molécule est considéré comme une masse ponctuelle dont le mouvement est déterminé par l'ensemble des forces exercées sur lui par les autres atomes en fonction du temps.

Une grande variété de mouvements peuvent animer les macromolécules biologiques, rendant ces systèmes dynamiques [82]. Ces mouvements s'étalent sur des gammes de temps allant de la femto-seconde à la seconde. Les mouvements possibles sont représentés sur la figure 8.1.

En plus de ces mouvements moléculaires, il y a l'ensemble des liaisons faibles : les liaisons hydrogènes, les interactions de Van der Waals, les interactions hydrophobes ou encore les interactions électrostatiques. Ce sont ces forces qui maintiennent la structure des protéines et qui conditionnent les mouvements moléculaires fondamentaux.

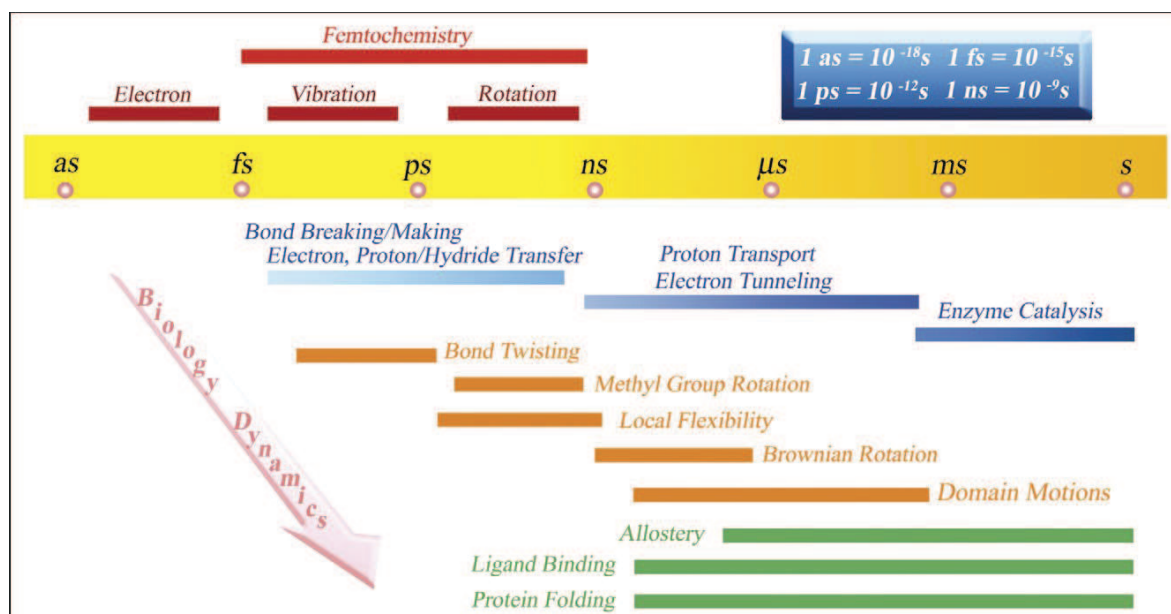


FIGURE 8.1 – Les échelles de temps des mouvements fondamentaux de dynamique moléculaire des protéines. Image provenant de l'article de Zhong, D. 2007[82]

Notre intérêt se porte plus particulièrement sur la dynamique mesurée dans des temps allant de la ps à la ns, avec des amplitudes de fluctuation de l'ordre de l'Angström. Cette gamme correspond à l'étude des forces de cohésion de la structure des protéines et permet ainsi de déterminer si la protéine est plutôt "dure" ou plutôt "molle".

Au cours de cette thèse, nous ne nous sommes pas intéressé à l'étude de la dynamique d'une protéine isolée, mais de l'ensemble du protéome d'*Halobacterium*. En effet dans les études *in vivo*, nous pouvons voir l'influence de l'environnement cellulaire sur le fonctionnement des macromolécules (cet environnement est souvent négligé à tort dans les études biochimiques et biophysiques des macromolécules).

La dynamique moléculaire d'une protéine est aussi sensible à l'environnement de la protéine qu'à sa structure. En effet, une protéine peut être inactive dans un environnement dans lequel elle est parfaitement stable. Donc la dynamique moléculaire d'une protéine dans le cytosol pourrait être très différente de celle mesurée dans des conditions

in vitro [83]. De plus, par la nature même des forces de stabilisation de sa structure tertiaire, la dynamique des protéines ne peut pas être étudiée sans prendre en compte l'influence du solvant physiologique et du cytosol [84]. A savoir le cytosol est un environnement encombré, avec des compartiments sub-cellulaire (où il y a co-localisation des protéines impliquées dans la même fonction). Cet environnement va complètement influencer la stabilisation des protéines, par les interactions avec leurs partenaires, des substrats, co-facteurs, ainsi que par les actions de solutés compatibles ou de molécules chaperonnes.

En effet, les macromolécules biologiques sont fonctionnelles à l'intérieur des cellules où l'environnement est fortement encombré par d'autres macromolécules et constituants cellulaires [85] (avec une concentration en macromolécules comprise entre 300 et 600 *mg/ml*[86] [87]). Le tout formant de grands complexes et réseaux ayant des interactions spécifiques et non spécifiques entre eux (figure 8.2).

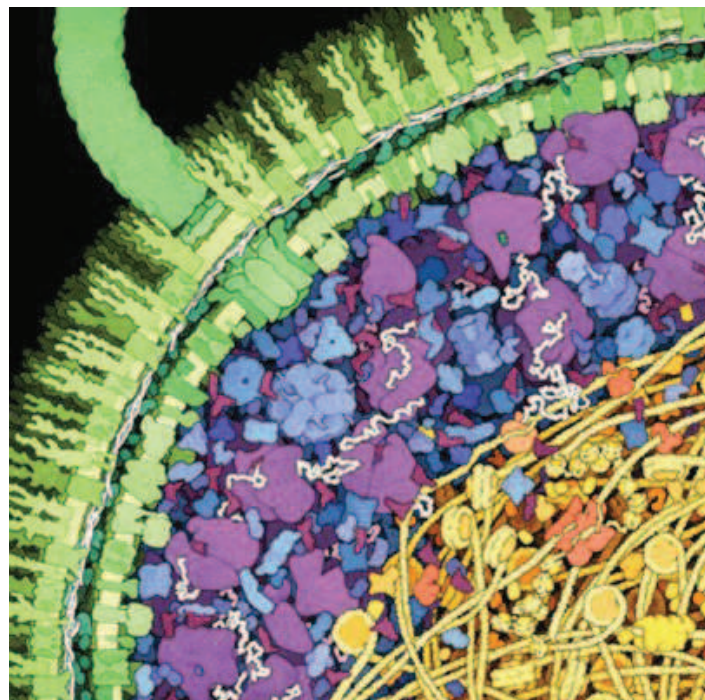


FIGURE 8.2 – Représentation du degré d'encombrement dans le cytoplasme d'*E.coli*. Source : Goodsell 1993. La membrane en vert est accompagnée d'un flagelle, le cytoplasme est représentée en bleu violet et la partie génomique en jaune orangé

L'influence de l'encombrement moléculaire provoquant des interactions non spécifiques peut être mimé, in vitro, par l'ajout d'agent d'encombrement à une solution de protéines purifiées, par contre l'encombrement moléculaire provoquant des interactions spécifiques ne peut pas être reproduit et est pour l'instant peu étudié.

Cet encombrement moléculaire spécifique donne lieu à deux effets contraires : d'un côté, il favorise l'association des macromolécules entre elles (permettant d'augmenter d'un facteur 2 ou 3 certaines constantes d'équilibre de réaction chimique, en diminuant l'énergie libre du milieu) et d'un autre côté, il réduit les coefficients de diffusion des molécules (d'un facteur pouvant aller jusqu'à 10 pour certaines molécules)[85] [88]. Ces perturbations ne doivent pas être négligées dans l'étude des processus biochimiques et dynamiques des macromolécules.

La présence des solutés compatibles peut influencer la stabilité et la solubilité des protéines. En effet, l'ajout d'osmolytes in vitro, peut prévenir de la perte d'activité des enzymes. De plus pour de nombreuses protéines, ces composés peuvent inhiber l'agrégation et la dénaturation thermique et chimique des protéines. De plus, les osmolytes peuvent induire la formation de structures secondaires, stabilisant des formes pré-repliées qui permettraient ensuite une accélération du processus de repliement. Cela suggère que les osmolytes n'ont pas un rôle uniquement dans le métabolisme, mais exercent également d'importantes fonctions physiologiques in vivo, en maintenant l'activité enzymatique et en stabilisant les structures des protéines [89]. Des études de dynamique moléculaire sur des protéines en présence de solutés compatibles a été réalisé par RMN et ont montré que l'interaction d'une protéine avec des solutés compatibles permettait d'augmenter la stabilité de la protéine, jusqu'à un retour à sa stabilité normale, en présence d'agent dénaturant [90].

Accéder aux paramètres de dynamique moléculaire moyens de l'ensemble du protéome cellulaire dans un micro-organisme vivant devient un atout majeur pour comprendre la dynamique réelle des protéines dans un contexte biologique.

Aujourd'hui, l'étude de la dynamique moléculaire au sein de cellules vivantes, appelée

par la suite ”dynamique intracellulaire”, constitue une étape clef dans la compréhension du fonctionnement des systèmes vivants.

La spectrométrie neutronique est bien adaptée à l’étude de la dynamique du protéome, par le fait que la longueur d’onde et l’énergie du neutron correspond parfaitement aux échelles des fluctuations (de l’ordre de l’Å) et de temps (de l’ordre de la pico- à la nano-seconde) de la dynamique des macromolécules.

8.1.2 La technique de diffusion de neutrons pour des analyses de dynamiques moléculaires d’échantillons biologiques

La diffusion incohérente de neutrons est une technique expérimentale de choix, non létale, pour étudier la dynamique moléculaire au sein de systèmes biologiques [91].

La technique est sensible aux mouvements des atomes d’hydrogène, qui représentent près de la moitié des atomes présents dans les structures biologiques et qui sont répartis uniformément au sein des structures.

Les gammes de temps et d’échelles de longueur utilisées, accessibles par la diffusion de neutrons, retracent les mouvements des atomes d’hydrogène qui sont corrélés aux mouvements des groupements chimiques auxquels ils sont liés, comme par exemple les chaînes latérales des acides aminés.

Les cultures cellulaires d’*H.salinarum* sont culottées, lavées, puis transférées dans un porte échantillon en aluminium plaqué or (figure 8.3). L’aluminium ne diffuse et n’absorbe quasiment pas en présence de neutrons et l’or permet d’éviter d’avoir des interactions ou des réactions chimiques entre l’échantillon et l’aluminium.

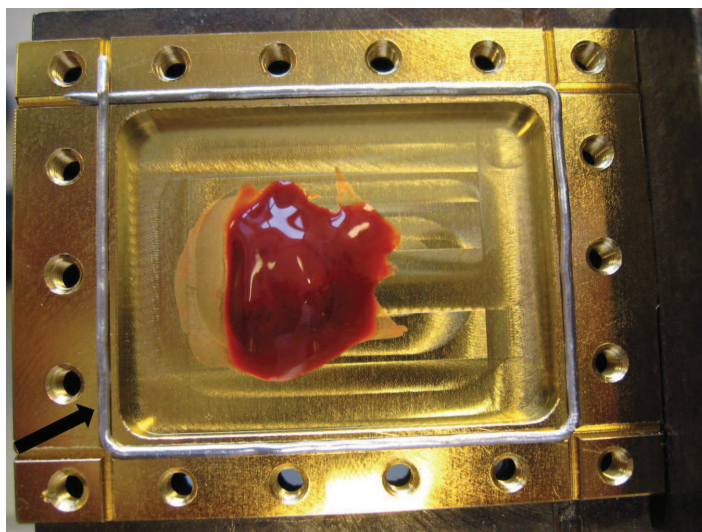


FIGURE 8.3 – **Porte échantillon et culot de *Halobacterium* pour les études de diffusion de neutrons** : le culot d'archées de couleur rouge du fait de la présence de pigment caroténoïde est placé au centre du porte échantillon (le couvercle n'apparaît pas sur la photo), un joint d'indium (position présentée par la flèche noire) permet de rendre le porte échantillon étanche après vissage du couvercle qui permet de fixer un volume et une épaisseur fixe (0,3mm) à l'échantillon.

Nous déposons le matériel cellulaire de telle sorte que tout le volume, entre la base du porte échantillon et le couvercle, soit rempli par 0.540 mg de culot pour un couvercle laissant 0.3mm d'épaisseur possible pour l'échantillon. Ensuite le porte échantillon est fermé (l'indium sert de joint) et sellé (avec des vis en aluminium). Le porte échantillon doit être complètement étanche, car lors de la mesure (qui dure en moyenne 20h) il sera dans une chambre de mesure sous vide. Nous vérifions la viabilité de nos cellules avant et après la mesure sur l'instrument afin de vérifier qu'aucun biais n'a affecté l'intégrité de nos cellules, comme par exemple la présence du vide dans le porte échantillon (du fait d'un mauvais montage ou d'une mauvaise étanchéité du joint).

Nous réalisons les mesures de diffusion, à l'Institut Laue-Langevin (ILL) de Grenoble, sur la ligne IN13 (photo de l'appareil de mesure 8.4).



FIGURE 8.4 – Photo de l'instrument IN13 de l'ILL

L'échantillon est exposé au faisceau de neutrons pendant 20h (3h de mesure pour chaque température au minimum).

Les neutrons sont diffusés par les noyaux atomiques de l'échantillon et la mesure de cette diffusion fournit des informations sur la vitesse et l'énergie des mouvements de ces atomes.

Le principe de mesure de l'instrument IN13 est décrit par la figure 8.5. En résumé, les expériences de spectroscopie neutronique de l'instrument IN13 reposent sur la mesure de changement de direction des neutrons du faisceau, suite à leur interaction avec les hydrogènes de l'échantillon. Des détecteurs sont placés autour de l'échantillon et permettent de compter les neutrons en fonction de leur angle de diffusion (voir figure 8.6).

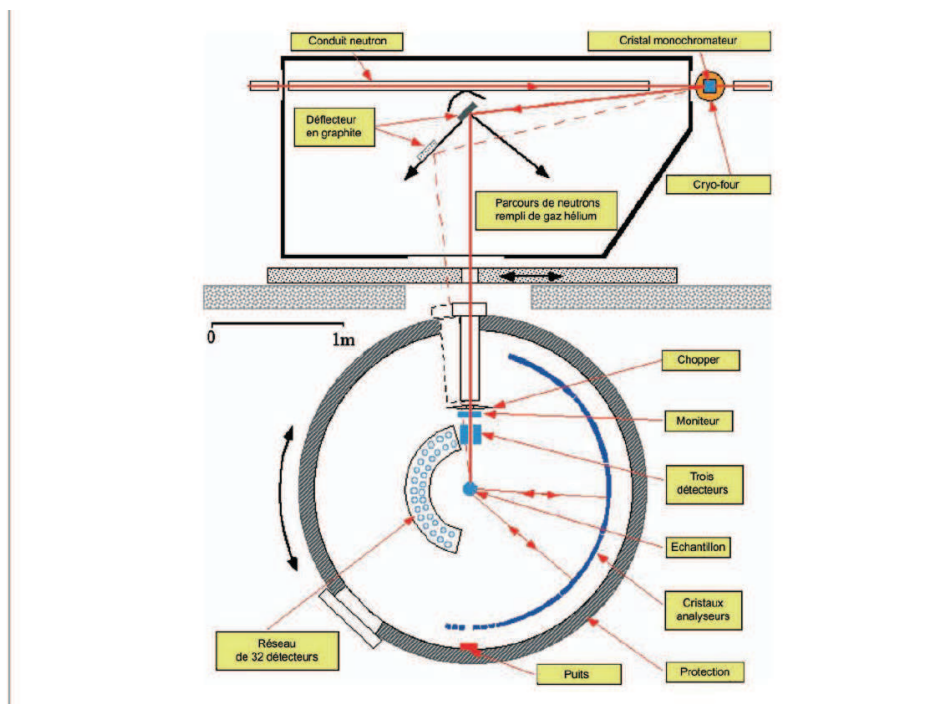


FIGURE 8.5 – **Principe du spectromètre à rétrodiffusion IN13 de l'ILL.** (Image et texte tirés de "Bioneutronique : la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines." Par Marion JASNIN [91]) Dans le cas d'une expérience de diffusion élastique, le faisceau de neutron est envoyé sur un monochromateur qui sélectionne la longueur d'onde incidente. Un déflecteur en graphite focalise ensuite le faisceau monochromatique sur l'échantillon. Les neutrons diffusés par l'échantillon sont analysés par des cristaux analyseurs. Ceux-ci sélectionnent ceux qui ont conservé leur énergie et les rétrodiffusent avec des angles de diffraction de 90° . Les neutrons sont finalement détectés par un jeu de 32 détecteurs à ^3He .

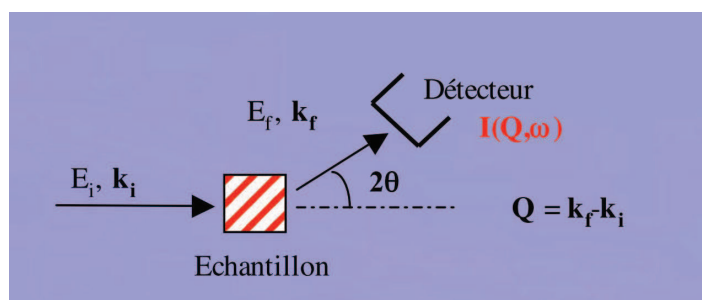


FIGURE 8.6 – **Schéma simplifié du processus de diffusion d'un neutron.** Image provenant du site web de la société française de neutron

La gamme de vecteur de diffusion (Q) ainsi que la résolution en énergie de l'expérience vont définir les échelles de temps et de longueur des mouvements atomiques obser-

vables. La résolution en énergie dépendante de l'instrument définit la limite inférieure des transferts d'énergie associés aux mouvements pouvant être observés. En choisissant convenablement ces valeurs, il est possible d'observer la dynamique interne d'une population de protéines in vivo.

La résolution en énergie utilisée sur cet instrument est de $8 \mu\text{eV}$ dans une gamme de vecteur de diffusion comprise entre $0.8 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$. Cette gamme correspond aux mouvements atomiques dans des temps de l'ordre de 0.1 ns .

Les expériences sont basées sur des "scans de température élastique", dans lesquels les neutrons sont diffusés dans une fenêtre d'énergie très étroite, autour de l'énergie du faisceau incident. Cette diffusion est observée en fonction de la température appliquée à l'échantillon. Ces mesures des données, une fois corrigées par les données d'intensité du porte-échantillon vide, de diffusion du tampon (nous estimons que dans notre culot il y a environ 60% de tampon à soustraire) et normalisées par la diffusion du vanadium (contrôle positif), permettent d'obtenir les valeurs de l'intensité élastique totale $I(Q, 0 \pm \Delta\omega)$.

Un exemple de données, d'un échantillon à différentes températures $\ln I(Q, 0 \pm \Delta\omega)$ en fonction de Q^2 obtenue par de diffusion de neutrons, est présenté dans la figure 8.7.

La pente du logarithme népérien, mesuré pour les courbes $\ln I(Q, 0 \pm \Delta\omega)$ en fonction de Q^2 de chaque température sur la gamme $0.8 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$, correspond au déplacement atomique carré moyen $\langle u^2 \rangle$ (MSD = Mean Square Displacement) [92]. L'équation qui relie $\langle u^2 \rangle$ à I est :

$$I(Q, 0 \pm \Delta\omega) = cte.exp(-\frac{\langle u^2 \rangle}{6}Q^2) - - - - - (EQ1)$$

La courbe $\ln I$ en fonction de Q^2 doit être une droite, ce n'est pas le cas expérimentalement sur toute la gamme de Q (voir figure 8.7), car ces données représentent un système complexe et la moyenne $\langle u^2 \rangle$ est sur plusieurs populations de mouvement. L'équation EQ1 est valable seulement pour des petites valeurs de Q par rapport à la fluctuation

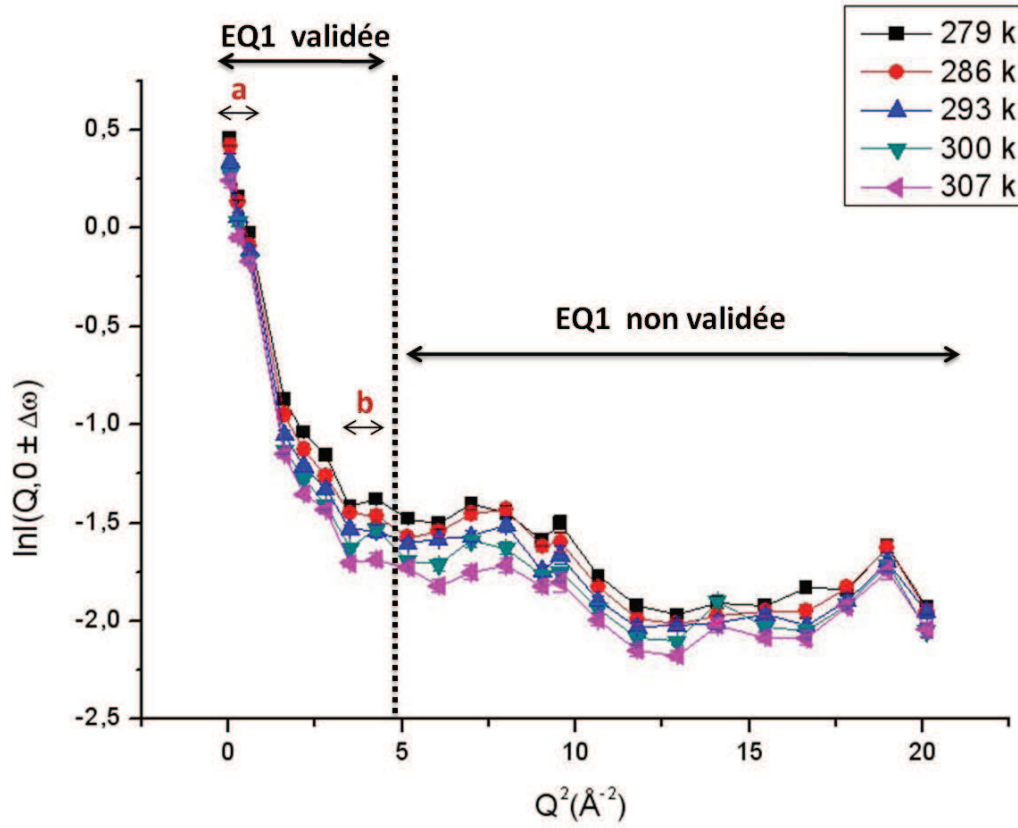


FIGURE 8.7 – Exemple d’une mesure de diffusion de neutrons à différentes températures de l’organisme *e.coli*. Les pointillés délimites la zone où l’équation EQ1 est valide. La zone "a" correspond à des mouvements lents de grandes amplitudes associés essentiellement à une population d’hydrogène de l’eau. La zone "b" correspond à des mouvements plus rapides de plus petites amplitudes associés essentiellement à une population d’hydrogène de macromolécule. La zone entre "a" et "b" peut être considéré comme un mélange de ces populations, plus on se dirigera vers la zone "a" plus on prendra en compte les mouvements des hydrogènes de l’eau, plus on se dirigera vers la zone "b" plus on prendra en compte les mouvements des hydrogènes des macromolécules.

mesurée, on considère que les données sont valables lorsque l’équation : $Q^2 u^2 \leq 2$ [92]. On considère que toute les données à droite de $Q^2 = 5$ ne correspondent pas à une diffusion exprimé par l’équation EQ1 et sont donc ignorées. De plus tous les mouvements mesurés et dont les données figures à gauche de $Q^2 = 5$ ne sont pas que des mouvements d’hydrogène des macromolécules. En effet dans cette zone de Q , il y a les mouvements des hydrogènes des macromolécules, mais aussi les mouvements des

hydrogènes de l'eau. Il sera donc nécessaire de délimiter une gamme dans cette zone de Q pour effectuer l'interprétation des résultats. Une étude de l'impact du choix de la gamme de Q a été réalisé et est présenté dans le chapitre 8.2.1.

En choisissant une gamme adéquate, la valeur du $\langle u^2 \rangle$ nous renseignera donc sur l'amplitude des mouvements des atomes d'hydrogène des protéines (c'est une mesure de distance, en \AA^2).

8.1.3 Interprétation des données de diffusion neutronique

J.Zaccai a proposé une analyse du MSF en fonction de la température, en terme de constante de force [92]. L'analyse a permis de relier la flexibilité des protéines à leur résilience.

A partir de la courbe $\frac{d\langle u^2 \rangle}{dT}$ (exemple figure 8.8), nous pouvons extraire la résilience $\langle k' \rangle$ qui correspond à la dureté (force, en N/m) des mouvements des atomes.

Par comparaison à un système dans lequel les liaisons hydrogènes peuvent être assimilées à des ressorts, $\langle u^2 \rangle$ correspond à la capacité d'élongation du ressort et $\langle k' \rangle$ la rigidité effective du ressort. $\langle k' \rangle$ ou résilience correspond à une constante de force effective qui prend en compte les fluctuations entropiques, mais aussi enthalpiques du système [92].

L'équation qui relie $\langle k' \rangle$ à $\langle u^2 \rangle$ est :

$$\langle k' \rangle = \frac{2k_b}{\frac{d\langle u^2 \rangle}{dT}} = \frac{0.00276}{\frac{d\langle u^2 \rangle}{dT}} \text{ --- (EQ2)}$$

(k_b correspond à la constante de Boltzmann : $k_b = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$)

La résilience est donc inversement proportionnelle à la pente du MSD en fonction de la température. Plus la pente du MSD en fonction de la température est grande, plus

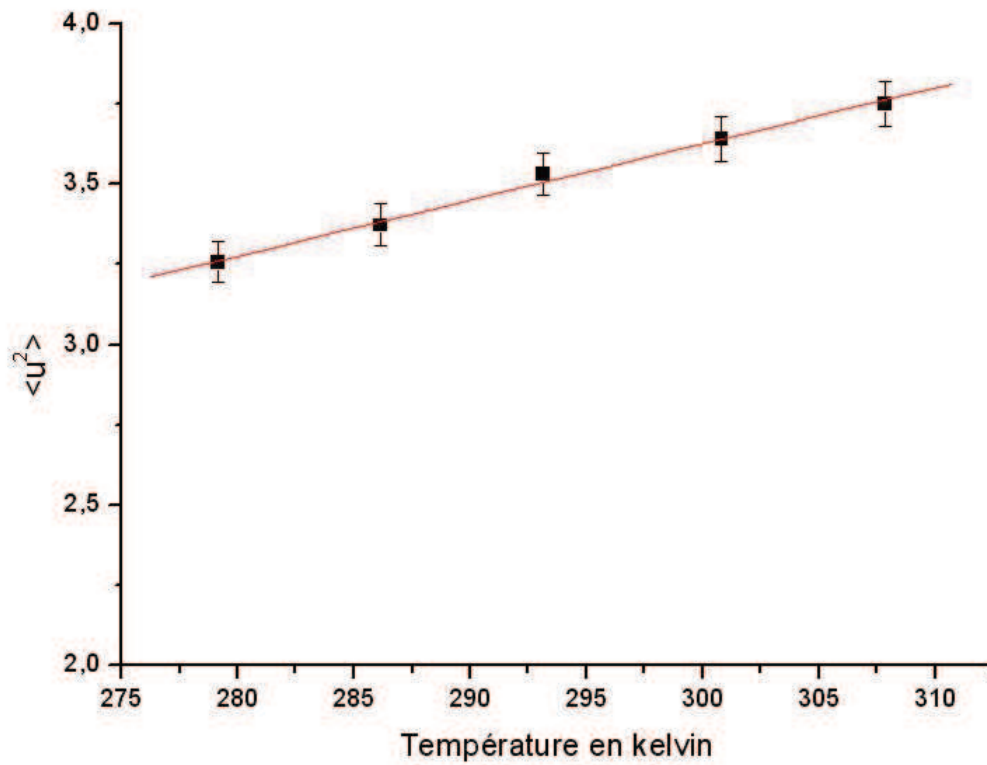


FIGURE 8.8 – **Courbe $\langle u^2 \rangle$ en fonction de la température de l'organisme *e.coli*** : Les valeurs ont été calculées à partir des données de la figure 8.7, la pente est représentée en rouge. Nous obtenons $\langle k' \rangle = 0.16 \text{ N/m}$

$\langle k' \rangle$ est petit et donc plus le système est mou (par rapport aux liaisons hydrogènes).

8.2 Résultats

8.2.1 Choix de la gamme de Q utilisée pour le traitement des données de *H.salarum* : étude de l'influence du choix de la gamme de Q sur les données de diffusion neutronique sur *E.coli*

Des études ont été réalisées en 2004 (Tehei et al. [93]), sur l'organisme témoin *E.coli* et sur des organismes psychrophiles, mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles et en 2008 (Jasnin et al. [94]) sur *E.coli* en présence de différents solvants. Ces études, réalisées au LBM et à l'ILL, ont constitué l'amorce d'une réflexion sur les possibilités offertes par la diffusion de neutrons pour étudier la dynamique macromoléculaire in vivo chez les archées halophiles.

Lors des études neutroniques précédentes sur des organismes vivants, des gammes de Q différentes ont été utilisées. Ainsi l'étude portant sur les organismes extrêmophiles utilisait généralement la gamme en Q $1.2\text{\AA}^{-1} < Q < 2.2\text{\AA}^{-1}$ (nommé "range 0"), et les études sur l'influence du tampon sur la dynamique moléculaire de l'organisme *E.coli* utilisait la gamme en Q $1.27\text{\AA}^{-1} < Q < 1.87\text{\AA}^{-1}$ (nommé range 1). Ce choix de gamme de Q est justifié pour visualiser le moins possible les mouvements liés aux atomes d'hydrogène de l'eau. Il était donc nécessaire de tester ces gammes et ainsi de choisir une gamme de Q adaptée à nos données. Nous souhaitons avoir une gamme de Q prenant en compte les mouvements des macromolécules, mais aussi les mouvements des hydrogènes de l'eau "associés" à ces macromolécules.

Pour cela, nous avons donc mesuré deux échantillons de cellule de *E.coli*, les données ont été traitées en collaboration avec Elisa Fabiani (post-doctorante du groupe ELMA à l'IBS) et les résultats sont présentés dans ce chapitre.

Les cellules *E.coli* en phase exponentielle de croissance ont été culottées, lavées puis enfermées dans le porte échantillon et la dynamique moléculaire des cellules a été mesurée environ 20 heures par diffusion neutronique. Une fois les fichiers de "data" obtenus,

les données sont traitées avec le logiciel "lamp" jusqu'à l'obtention des valeurs de "I" en fonction de "Q", pour les échantillons et le tampon. La soustraction et le reste des calculs sont fait indépendamment sur le logiciel "origine" (homologue du logiciel "Excel" mais plus performant) afin de limiter les étapes de calculs dans le logiciel "lamp" et ainsi contrôler et vérifier chaque étape du calcul.

Le choix d'une gamme en Q commençant à $1,2\text{\AA}^{-1}$ avait été fait, car l'intensité présente dans les Q plus petit est composée de l'intensité des protéines, mais surtout de l'intensité de l'eau libre du solvant (voir figure 8.9). Une étude de la prise en compte des intensité des Q plus petit que $1,2\text{\AA}^{-1}$ est donc nécessaire, pour pouvoir effectuer notre choix de gamme de Q , en sachant que nous voulons prendre en compte les mouvements des hydrogènes des molécules d'eau liées aux macromolécules et que les intensités de diffusion neutronique de l'eau du solvant ne nous intéresse pas.

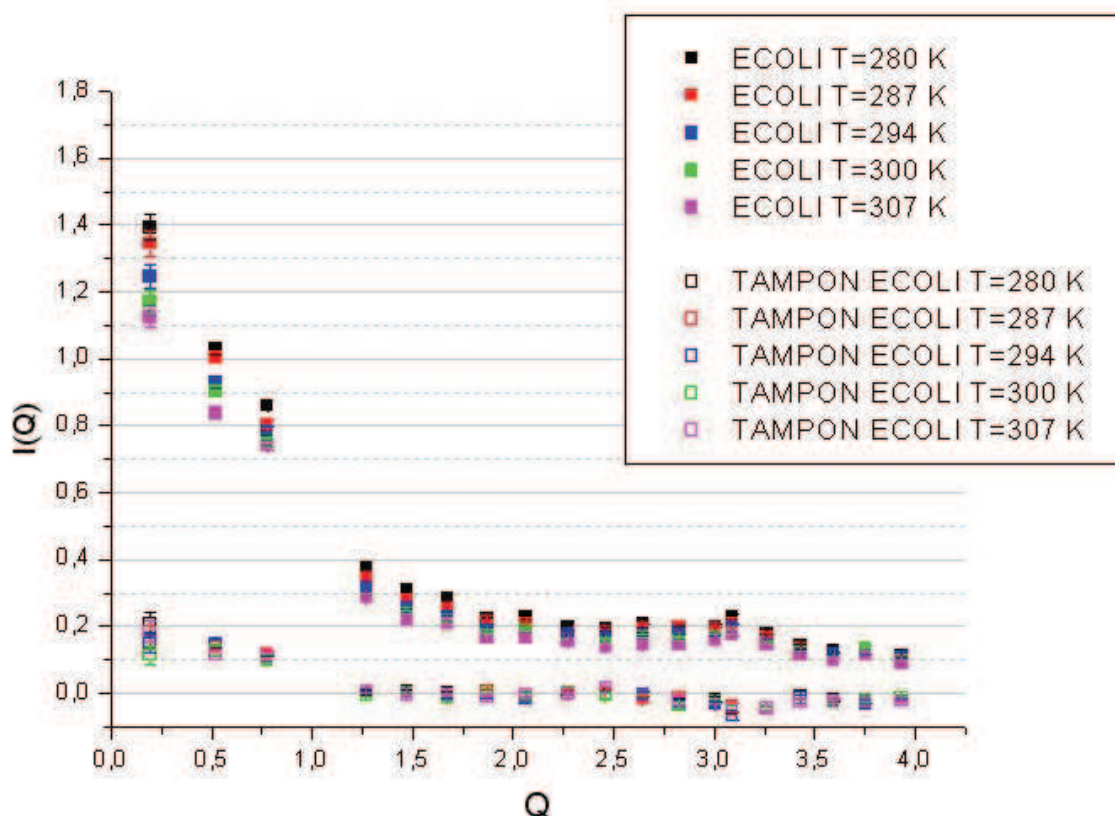


FIGURE 8.9 – Comparaison de la dynamique moléculaire d'un échantillon d'*E.coli* et de son tampon à différentes températures. L'intensité "I" est tracé en fonction de l'angle "Q".

Pour ne pas prendre en compte l'intensité des molécules d'eau du solvant, dans les études précédentes, l'intensité du tampon était soustraite quelque soit la gamme de Q utilisée. Il est donc nécessaire de soustraire l'intensité du tampon de façon la plus juste possible, en prenant en compte la quantité de tampon présent dans le culot cellulaire. Pour estimer la quantité de tampon présent il est nécessaire de comparer la masse du culot avant et après évaporation de l'eau (mis dans une étuve à 80°C). Le résultat obtenu est qu'il faut pour corriger l'intensité de l'échantillon soustraire environ 60-70% de l'intensité du tampon. Hors en regardant les valeurs des intensité du tampon et de l'échantillon, on remarque deux choses :

- Dans la gamme de Q range 0 et range 1, l'intensité du tampon est proche de 0,

donc il n'est pas nécessaire de soustraire le tampon.

- Pour les Q inférieur à 1.2\AA^{-1} il est clair, que l'eau diffuse plus dans ces "petits Q ". Mais dans cette portion l'intensité des protéines est bien plus forte que dans la gamme aux alentours de $1,5\text{\AA}^{-1}$ (environ 3 fois plus intense). On peut estimer que l'intensité du tampon (et donc de l'eau) comparé à l'intensité de l'échantillon est inférieure à 12%, donc si on considère que l'intensité du tampon présent dans l'échantillon correspond à 70% de l'intensité du tampon seul, la différence entre les deux n'est pas de 12% mais de 8%, donc finalement l'intensité de l'eau dans cette gamme de Q semble assez négligeable. Donc si la soustraction est estimée correcte, il est possible de travailler avec ces "petit Q ".

Nous n'avons pas considéré le dernier point de la gamme "range 0" car ce point présente une grande barre d'erreur essentiellement due au fait qu'à cet angle on observe de fortes fluctuations de l'intensité par la contamination d'intensités liées à l'aluminium. La suite de ce chapitre va expliquer quels sont les critères que nous avons pris en compte pour choisir une nouvelle gamme de Q . Cette étude est basée sur les données de l'organisme *E.coli* uniquement, mais il est à savoir qu'elle a été aussi réalisée sur les données de *H.salinarum* (données non montrées).

A partir des données obtenues pour les deux échantillons *E.coli* les courbes $\ln(I)$ en fonction de Q^2 ont été tracées (voir figure 8.10).

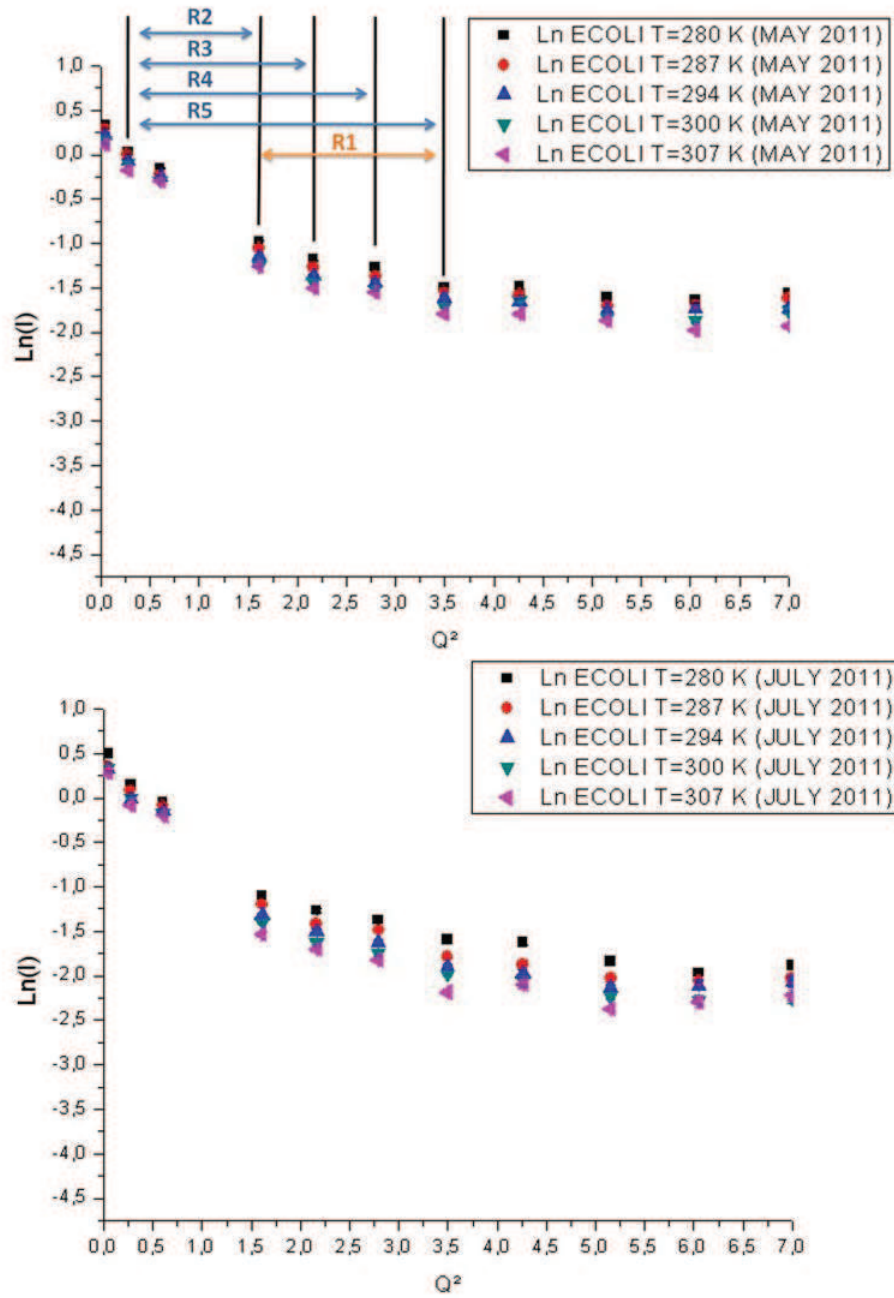


FIGURE 8.10 – Comparaison de la dynamique moléculaire entre deux échantillons différents de *E.coli* et choix de la gamme de Q^2 pour le fit permettant d'obtenir la valeur de $\langle u^2 \rangle$. Nuage de points du $\text{Ln}(I)$ en fonction de Q^2 pour chaque températures expérimentales. En haut, donnée obtenue en mai 2011, en bas donnée obtenues en juillet 2011, pour l'organisme *E.coli* DH5 α . Pour les gammes de Q^2 , R1 correspond à la gamme $1,6 < Q^2 < 3,49$; R2 à la gamme $0,27 < Q^2 < 1,6$; R3 à la gamme $0,27 < Q^2 < 2,16$; R4 à la gamme $0,27 < Q^2 < 2,79$; R5 à la gamme $0,27 < Q^2 < 3,49$.

Sur cette figure sont représentées les autres gammes de Q testées pour traiter les données ("R" correspond à "Range"). Comme il est possible de voir les deux jeux de données ne sont pas exactement identiques, cela peut être due à de nombreux facteurs étant donné que nous travaillons sur des échantillons biologiques vivants complexes. Pour chaque gamme (de R1 à R5) les $\langle u^2 \rangle$ ont été calculés (voir figure 8.11), puis les $\langle k' \rangle$ (voir 8.12).

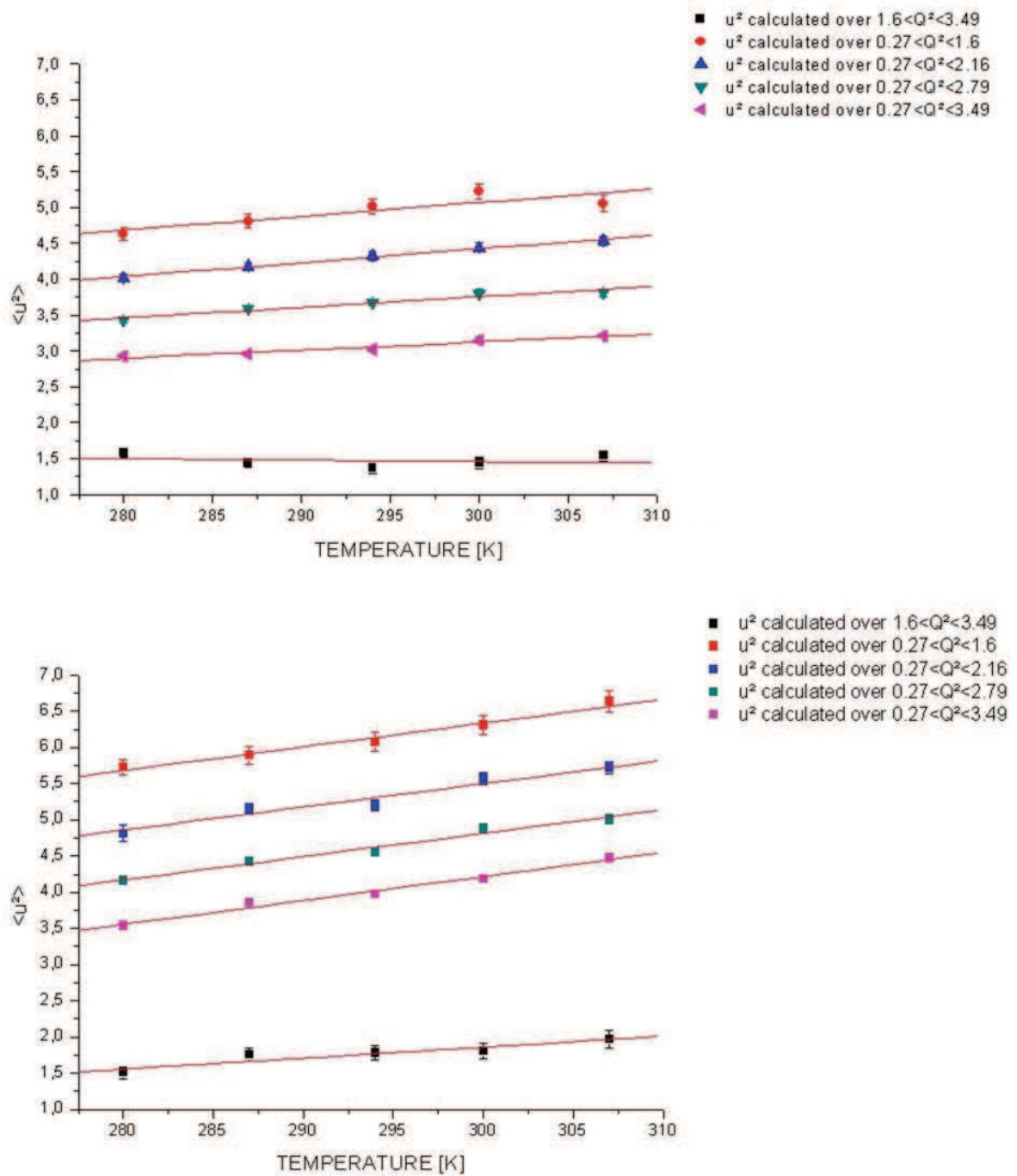


FIGURE 8.11 – Comparaison des $\langle u^2 \rangle$ obtenues pour les données mai et juillet 2011 pour l'organisme *E.coli* en fonction du choix de la gamme en Q^2 . En haut, données obtenues en Mai 2011. En bas, données obtenues en Juillet 2011.

En observant les deux jeux de données sur la figure 8.11, il est intéressant de no-

ter que le choix de la gamme de Q interfère sur la valeur moyenne des $\langle u^2 \rangle$, plus la gamme utilise des Q "grand" plus la valeur moyenne des $\langle u^2 \rangle$ est basse. Par contre, il est aussi visible que pour les gammes range 2 à range 5 les pentes obtenues sont parallèles entre elles (donc devrait donner une même information au niveau de la résilience de l'échantillon) et que ce n'est pas le cas pour la gamme range 1 (les points en noirs sur la figure). La gamme "range 1" ne semble donc pas adaptées pour visualisé une moyenne des résiliences de l'eau en interaction avec les macromolécules et des macromolécules elles-même.

En comparant les valeurs de $\langle k' \rangle$ résultants des deux jeux de données (voir 8.12), il est clairement visible que les gammes R2 à R5 donnent des valeurs de $\langle k' \rangle$ très similaires avec une faible barre d'erreur.

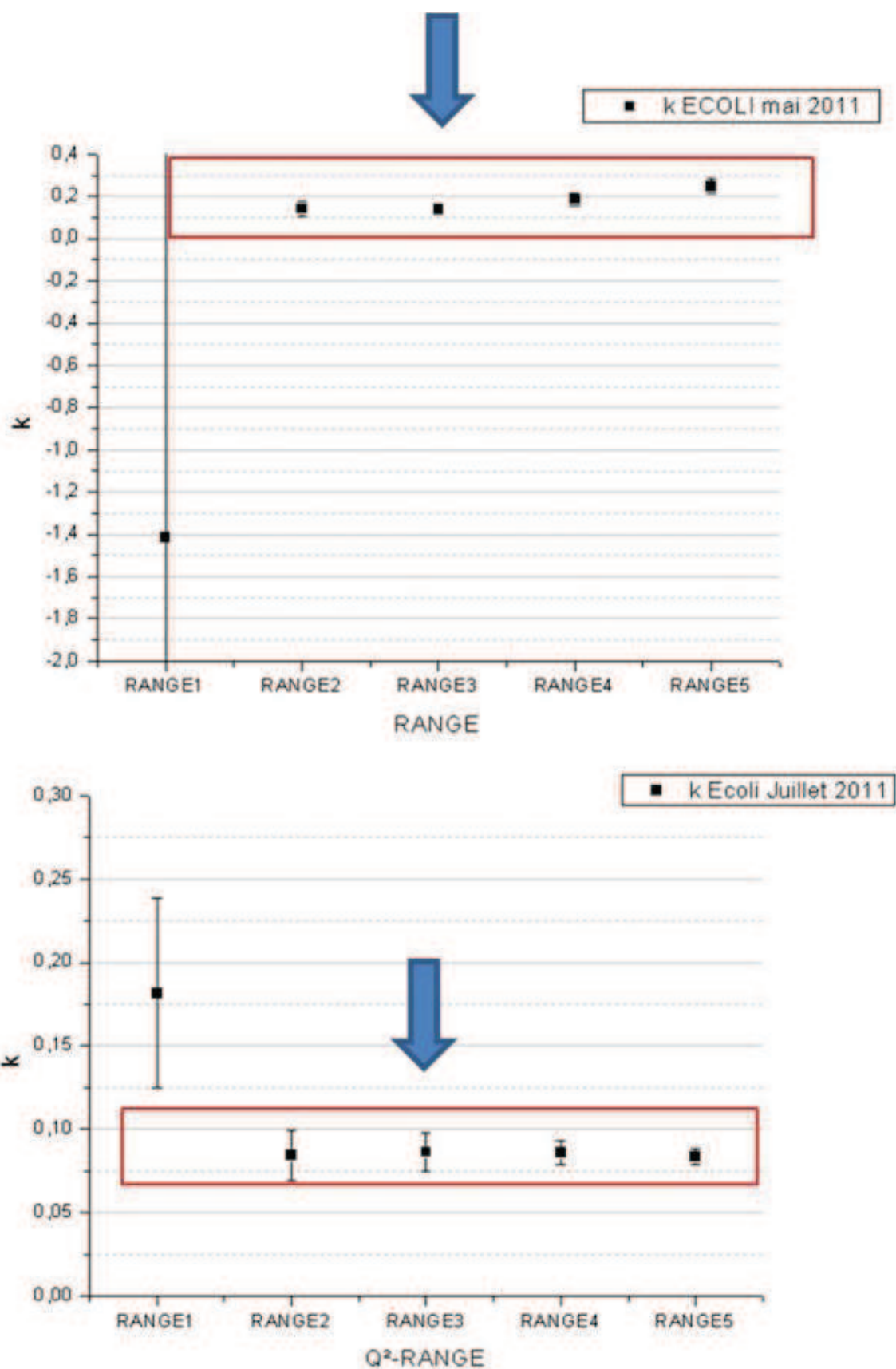


FIGURE 8.12 – Comparaison des valeurs des $\langle k' \rangle$ obtenues pour les différentes gammes de Q^2 pour les données de *E.coli* mesurées en Mai et en Juillet. Les flèches désignent la gamme choisie pour traiter les données au cours de l'étude réalisée sur le protéome de *H.salinarum*.

Nous avons finalement choisi la gamme range 3 ($0,27 < Q^2 < 2,16$), bien que toutes les gammes testées (sauf range 1) donnent une valeur de $\langle k' \rangle$ presque équivalente. Nous avons choisi la gamme range 3, car la gamme range 1 possède peu de point pour avoir une bonne statistique lors des régressions linéaires ; les points des gammes range 4 et 5 du graphique 8.10 montrent que leur alignement n'est pas linéaire et donc que leur utilisation pour calculer une pente est peu justifiable mathématiquement.

Cette petite étude ma permit aussi de réaliser, que le traitement des données est très sensible et que la "manière" d'effectuer les corrections peut influencer les résultats finaux. De ce fait, il me semble que cet outil (la diffusion de neutron) permet d'obtenir de bonnes informations de dynamique moléculaire entre les différents échantillons, qu'il ne faut pas se focaliser sur les "nombres" des valeurs obtenues, mais sur les "comparaisons" des valeurs ($\langle u^2 \rangle$ et $\langle k' \rangle$) obtenues pour des échantillons traités exactement de la même façon et si possible mesurés en même temps.

8.2.2 Mesure de la résilience moléculaire du protéome *Halobacterium salinarum*

Les expériences ont été réalisées sur le spectromètre IN13 à l'Institut Laue Langevin. Les cellules d'*Halobacterium* ont été cultivées [95] et culottées au cours de leurs phases exponentielles de croissance (DO entre 0.8 et 1.0). Une partie du prélèvement est utilisé pour obtenir des informations complémentaires en plus de la DO à 600nm : le nombre de cellules (compté sur lame de Neubauer par microscopie par contraste de phase), la viabilité (les cellules sont incubées avec les réactifs kit live/dead d'Invitrogène permettant de discriminer les cellules mortes des cellules vivantes par microscopie fluorescence), la concentration de sel intracellulaire (par ICP). Pour les expériences de diffusion de neutrons, les culots de cellules sont lavés avec un tampon contenant une concentration saline équivalente au milieu de culture (voir M&M). Le culot résultant a

été chargé dans le porte-échantillon doré de 0.3mm d'épaisseur. Une mesure préalable de la transmission aux neutrons est effectuée sur les échantillons, ces mesures montrent une transmission d'environ 90% pour le faisceau de neutrons 2,23 Å.

Des contrôles ont été effectués pour s'assurer que les cellules restent en vie et en bon état physiologique au cours des expériences de diffusion. Pour cela les mêmes contrôles sont réalisés en fin d'expérience : le nombre de cellules, la viabilité, la concentration de sel intracellulaire. De plus, lors des comptages, une étude des changements morphologiques cellulaires a été réalisée. L'ensemble des protocoles utilisé est décrit dans le chapitre VI.

Dans toutes les figures présentées, les points à "t=0" correspondent à un point contrôle réalisé sur des cultures en début d'expérience. Les points "t=1h" correspondent quand à eux à l'étape où les cultures sont culottées afin de les déposer dans le porte échantillon, c'est à dire à des cultures après 1 heure d'incubation (nous avons respecté ce délais afin de pouvoir comparer plus tard ces résultats à des résultats de cultures soumis à un stress pendant 1 heure. Les points "t=24" correspondent à la fin de l'expérience de diffusion de neutrons, après ouverture du porte-échantillon.

Pour les cellules d'*E.coli*, le protocole de préparation des cellules est le même que celui utilisé dans l'article de "Tehei *et al*, 2004".

Les valeurs résiduelles de la viabilité cellulaire sont de l'ordre de 98% après 24 heures d'enfermement des cellules dans le porte échantillon, dont 20 heures soumis au passage du faisceau de neutrons. Aucune modification morphologique ou modification dans la composition du K^+ intracellulaire n'a pu être détectée (donc la concentration en K^+ reste autour de 3.6M et les cellules ont une forme en batonnet).

Les données de la diffusion élastique incohérente ont été recueillies avec une résolution en énergie de $8 \mu\text{eV}$ dans un vecteur de diffusion des $0.8 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$. Les données d'intensité obtenues ont été normalisées par la diffusion du vanadium, puis corrigées par la diffusion du porte-échantillon et du tampon, pour obtenir l'intensité I en fonc-

tion du vecteur de diffusion Q pour chaque température de chaque échantillon. Pour chaque échantillon et pour chaque point de température, il a été réalisé un graphique de $\ln[I(Q, \text{élastique})]$ en fonction de Q^2 . Le déplacement atomique carré moyen (MSD) $\langle u^2 \rangle$ est calculé à partir de la pente obtenue. Les mesures de MSD sont ensuite tracées en fonction de la température pour déterminer la constante de force $\langle k' \rangle$, aussi appelée "résilience", à partir de la pente des données. Pour plus d'information voir chapitre 8.1.2

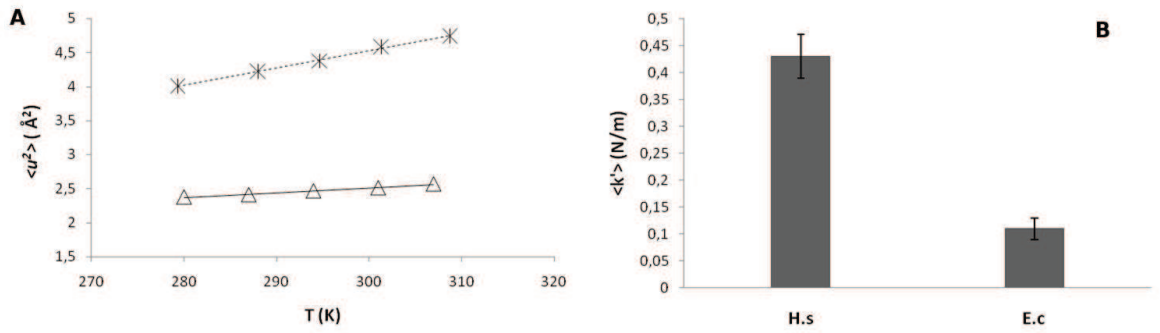


FIGURE 8.13 – **Comparaison de la flexibilité et de la résilience macromoléculaire moyenne $\langle k' \rangle$ (rigidité) du protéome d'*Halobacterium* et d'une mésophile (*E.coli*).** **A.**Déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ de l'organisme *H.salinarum* et *E.coli* en fonction des températures expérimentales, dans la gamme de $0.8 \text{ Å}^{-1} < Q < 1,7 \text{ Å}^{-1}$. En triangle, données du protéome de *H.salinarum* et en étoile celles de *E.coli*. **B.** Histogramme des constantes de force moyennes, décrivant la résilience macromoléculaires, calculées à partir des pentes du déplacement carré moyen de la figure A (les barres d'erreur sont obtenues par la répétition des mesures).

La figure 8.13 montre la comparaison entre les $\langle u^2 \rangle$ à différentes températures et les $\langle k' \rangle$ d'*Halobacterium salinarum* et celle de l'organisme mésophile *E.coli*, dans la gamme de Q "range 3". Etant donnée que n'utilisons une gamme de Q différentes de celles utilisées dans les articles ref [94] et [93], il est normal que nous n'obtenions pas les mêmes valeurs de $\langle u^2 \rangle$ et $\langle k' \rangle$ que celles présentées dans ces articles (voir chapitre 8.2.1 pour plus de détail quand au choix de la gamme de Q).

Pour toutes les températures utilisées pour les mesures de diffusion, il est intéressant de voir que la valeur des $\langle u^2 \rangle$ du protéome mésophile est supérieure à celle de l'halophile,

on peut donc en conclure que les protéines composant le protéome halophile sont moins flexibles que celles de l'organisme mésophile mesurées dans cette étude. De plus, les mesures ont montré que la résilience ($< k' >$) du protéome *Halobacterium salinarum* est nettement supérieure (plus de 4 fois) à celle de *E.coli* et témoigne d'une résilience du protéome halophile plus élevée que celle de la mésophile. Des travaux antérieurs sur des malates déshydrogénases halophiles purifiées suggéraient que la grande résilience des protéines adaptées aux concentration en sel élevé est due à la contribution enthalpique de l'énergie libre (plus grande "rigidité") [96]. Nous ne pouvons pas exclure, cependant, que d'autres facteurs cytoplasmiques d'*Halobacterium salinarum* contribuent également à l'obtention d'une résilience élevée.

8.2.3 Modification de la dynamique moléculaire du protéome de *H.salinarum* dans des conditions expérimentales hyposalines

Afin d'examiner l'influence de la variation de la concentration en sel sur la dynamique du protéome *Halobacterium salinarum* dans un contexte cellulaire, nous avons étudié l'effet d'une baisse de salinité de l'environnement extracellulaire (milieu de culture) sur la concentration en K^+ du cytoplasme. Pour réaliser cette baisse de concentration externe en NaCl, des dilutions avec un milieu de culture sans NaCl (milieu Hs 0M) sont réalisées. Nous avons dans un premier temps observé l'effet de différentes dilutions avec du milieu Hs 0M sur la croissance des cellules afin de choisir des conditions générant un stress non létal pour les cellules (voir figure 8.15). Puis dans un second temps, une quantification de la modification de la concentration du sel intracellulaire (K^+) par l'abaissement de la concentration externe en NaCl du milieu de culture a été réalisé (voir figure 8.16). Il a été choisi deux conditions de stress hypo-salin : une conditions en NaCl extracellulaire de 2,5M et une de 2,0M.

Une expérience contrôle a aussi été réalisée, elle correspond à un échantillon tota-

lement lysé par un choc osmotique important : une culture cellulaire en phase exponentielle a été culottée, lavée, transférée dans un boudin de dialyse et une dialyse a été réalisée pendant toute une nuit contre un tampon sans NaCl dont les autres composants sont identiques au tampon de lavage normal. A la fin de la dialyse, il est possible de voir l'aspect glaireux du culot, signifiant une lise des cellules et une large dénaturation des composants cellulaires. Ce culot est homogénéisé par agitation et déposé sur un porte-échantillon puis la mesure de diffusion de neutrons est réalisée (voir figure 8.14).

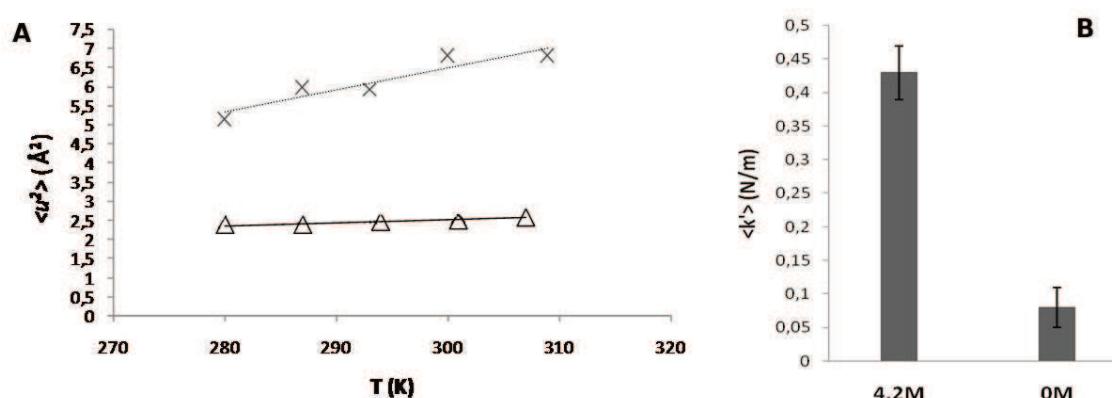


FIGURE 8.14 – **Comparaison de la dynamique moléculaire entre un protéome intact de *H.salinarum* et des cellules lysées de *H.salinarum* par choc osmotique ; A.** Comparaison de la flexibilité du protéome entre *H.salinarum* en conditions normales (triangle) et lysé par choc osmotique (une culture culottée de *H.salinarum* dialysée pendant une nuit contre un tampon sans NaCl). **B.** Comparaison de la résilience du protéome entre *H.salinarum* en conditions normales (4,2M) et lysé par choc osmotique (0M)

La dynamique moléculaire du protéome dénaturé en conditions de basse salinité de *H.salinarum* (figure 8.14) est très éloigné de l'échantillon intact. La flexibilité est largement supérieure quelques soient les températures de mesure utilisées et la résilience est plus de 5 fois inférieure à la condition normale. Il existe un biais dans cette expérience : lors de la dialyse, il est possible de perdre les petits solutés, cette perte pourrait engendrer une baisse du signal et donc des fluctuations de la flexibilité et de la rigidité. Pour enlever ce biais, une étude sur la dynamique du protéome de cellules lysées puis dialysées, comparées au protéome de cellules seulement lysées a été réalisée et est traitée

au chapitre 8.2.6. Ce résultat important peut servir de "limite" négative, pour les mesures de flexibilité et de rigidité du protéome lors de chocs/stress osmotiques.

Pour les stress à 2,5M et 2,0M NaCl extracellulaire, les cultures cellulaires stressées sont cultivées pendant 1 heure, puis culottées, lavées, déposées sur le porte-échantillon et mesurées par diffusion de neutrons. Comme pour l'étude précédente le nombre de cellules, la viabilité, les changements morphologiques et la concentration de sel intracellulaire sont mesurés avant le stress ($t=0$), avant de déposer les cellules dans le porte-échantillon ($t=1h$) et après les mesures de diffusion ($t=24h$).

Comme déjà signalé, le taux de croissance de *Halobacterium salinarum* est affecté en dessous de 3M NaCl et une baisse drastique de la viabilité cellulaire est observée lorsque la concentration en sel chute en dessous de 2M (voir résultats figure 8.15).

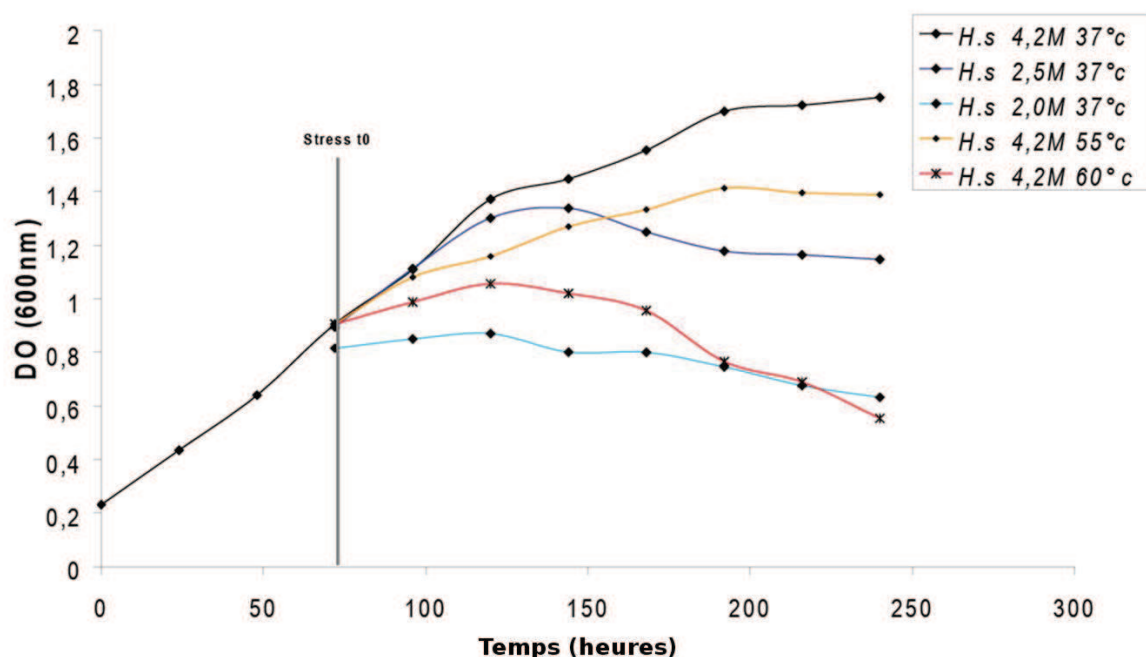


FIGURE 8.15 – Suivi de la croissance de cultures d’*H. salinarum* en conditions optimales (4,2M, 37°C) et de cultures soumises à $t=0$ à différents stress environnementaux ; voir encadré pour la légende des stress. Comparé aux conditions optimales (4,2M 37°C), il est possible de séparer l’intensité perçue du stress par l’organisme *H. salinarum* en deux catégories : les conditions de stress à 2,5M/37°C et un stress à 4,2M/55°C ne permettent plus une croissance optimale, mais n’arrêtant pas la croissance ; les conditions de stress 2,0M/37°C et 4,2M/60°C quand à elles arrêtent rapidement la croissance cellulaire. Il est à noter que des stress plus intenses sont létaux pour ces organismes.

Toutefois, nous avons constaté que, entre 2.5-2M, les cellules d’Halobacterium survivent en majorité avec un taux de viabilité de 90% et cela pendant de longues périodes (8.16). A 2.5M les cultures cellulaires conservent une légère croissance et une viabilité maximale, mais entre plus tôt en phase stationnaires ; par contre les cultures cessent de croître aux alentours de 2M. Des taux de viabilité élevés (supérieur à 80%) ont été trouvés après 24 heures d’enfermement dans le porte-échantillon soumis au faisceau de neutrons (voir tableau 8.16).

Conditions		Viabilité après différents temps d'exposition aux stress (en %)		
T°C	[Na ⁺] _{extracellulaire}	temps = 0	temps = 1h	temps = 24h
37°C	4,2M	99 +/- 1	99 +/- 1	99 +/- 1
37°C	3,0M	99 +/- 1	99 +/- 1	98 +/- 2
37°C	2,5M	99 +/- 1	99 +/- 1	93 +/- 4
37°C	2,0M	90 +/- 3	89 +/- 4	81 +/- 6
45°C	4,2M	99 +/- 1	99 +/- 1	98 +/- 2
55°C	4,2M	99 +/- 1	99 +/- 1	97 +/- 3
60°C	4,2M	99 +/- 1	97 +/- 2	84 +/- 4

FIGURE 8.16 – Tableau résumant les résultats de viabilité de l'organismes *H.salinarum* soumis aux différentes conditions de stress. La viabilité a été quantifiée par comptage des cellules sur lame de numération "Neubauer" au microscope confocal et par coloration des cellules mortes et vivantes par les composants du kit 'Live/dead d'Invitrogen (voir Matériel et Méthodes).

Nous avons aussi mesuré aux cours des différentes étapes de l'expérience, les variations de la concentration intracellulaire en K⁺ dans les deux conditions hypo-salines. Ces expériences ont révélé que dans les cellules vivantes intactes la concentration intracellulaire en K⁺ diminue en fonction de la concentration de NaCl externe (voir tableau 8.17). L'équilibre a été atteint après 1 heure et est resté stable après 24 heures. Dans ces conditions, la concentration intracellulaire en K⁺ a été abaissé à 2.2 M et 1.6 M pour les concentrations extracellulaires en NaCl respectivement de 2.5 et 2M.

Conditions		[K ⁺] _{intracellulaire} après différents temps d'exposition aux stress	
T°C	[Na ⁺] _{extracellulaire}	temps = 1h	temps = 24h
37°C	4,2M	3,6M +/- 0,3M	3,6M +/- 0,2M
37°C	3,0M	2,9M +/- 0,2M	2,7M +/- 0,2M
37°C	2,5M	2,25M +/- 0,4M	2,0M +/- 0,3M
37°C	2,0M	1,55M +/- 0,1M	1,5M +/- 0,1M

FIGURE 8.17 – Tableau résumant les résultats de dosage de la concentration en K⁺ intracellulaire de l'organismes *H. salinarum* soumis aux différentes conditions de stress hypo-salins. Les mesures de concentration en K⁺ ont été réalisées par spectrométrie de flamme (voir Matériel et Méthodes pour plus de précisions sur la technique utilisée)

Nous avons mesuré le MSD des cellules exposées à de telles conditions hypo-saline (8.18 A). Nous pouvons observer qu'à toutes les températures expérimentales, les valeurs des MSD sont déplacée vers le haut par rapport au témoin non stressé. Ces valeurs indiquent que l'amplitude des mouvements moléculaires est accrue. Les valeurs de résilience correspondantes ($\langle k' \rangle$) ont été calculées à partir des pentes de la température (8.18 B). Nous pouvons observer que plus la concentration en sel extracellulaire diminue, plus la concentration en K⁺ intracellulaire diminue, cela impacte sur le protéome par un MSD qui augmente (donc la flexibilité du protéome augmente), ainsi que par une résilience en diminution (donc une rigidité moindre). Or, des mesures de protéines dépliées ont été réalisées et ont montré de plus grandes fluctuations du MSD et de faibles résiliences par rapport à l'état replié [97] [98]. Ainsi, on peut en déduire que le dépliement des protéines a déjà commencé dans le cytosol *Halobacterium salinarum* pour ces conditions hypo-salines "douces". Par contre ces valeurs sont encore loin du contrôle 0M dans lequel des cellules sont complètement lysées et pour lequel les valeurs mesurées traduisent probablement un état avancé de dépliement de la plupart des protéines.

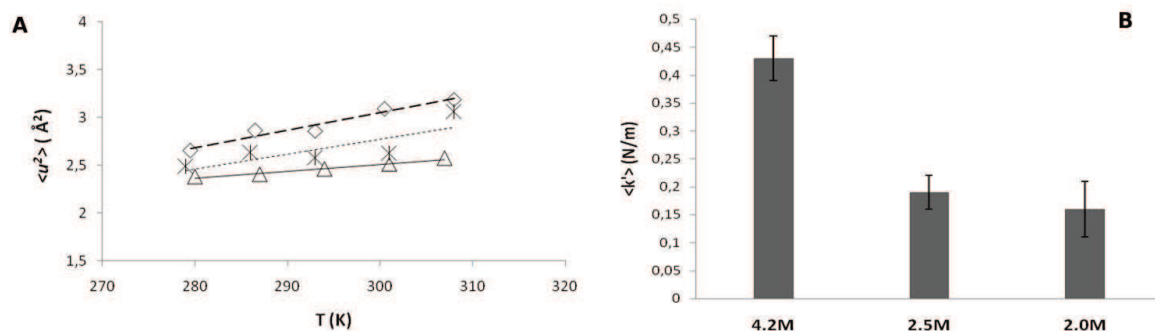


FIGURE 8.18 – **Effets des conditions environnementales hypo-salines sur la dynamique moléculaire du protéome de *H.salinarum*.** **A.**Déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ de l'organisme *H.salinarum* soumis à des conditions environnementales hypo-salines en fonction des températures expérimentales, dans la gamme de $0.8 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1,7 \text{ \AA}^{-1}$. En triangles, *H.salinarum* cultivé en conditions normales (4,2M NaCl); en croix *H.salinarum* soumis à un stress hypo-salin de 2,5M NaCl; en losanges, *H.salinarum* soumis à un stress hypo-salin de 2,0M NaCl. **B.** Histogramme des constantes de force moyennes, décrivant la résilience macromoléculaire, calculées à partir des pentes du déplacement carré moyen de la figure A (les barres d'erreur sont obtenues par la répétition des mesures).

Inversement, bien qu'il soit possible d'observer une perturbation importante de la flexibilité et de la rigidité des protéines au cours des stress à 2,5M et 2,0M NaCl extracellulaire, les valeurs de dynamique moléculaire du protéome sont encore loin des valeurs du profil de dénaturation totale des protéines de *H.salinarum*. Mais il est intéressant de remarquer que dans cette gamme de Q , la résilience de l'organisme *H.salinarum* soumis à un stress salin est proche de la résilience de l'organisme *E.coli* dans des conditions physiologiques normales. En conclusion les protéines repliées du protéome de *E.coli* sont moins résilientes que celles de protéome de *H.salinarum* et aussi "molles" que celles de *H.salinarum* partiellement dépliées.

8.2.4 Modification de la dynamique moléculaire lors des stress thermiques

Nous avons voulu explorer l'hypothèse que la faible résilience et l'augmentation du MSD observées au cours des stress hypo-salins correspond au dépliement des protéines, pour cela nous avons effectué des mesures de dynamique moléculaire du protéome *Halobacterium salinarum* in vivo sous contrainte thermique.

Les halophiles extrêmes représentent d'excellents modèles pour étudier l'effet du stress thermique, puisque, par rapport aux mésophiles, ils peuvent résister à des plages de température plus large. De même que pour les mesures de faible stress salin, des expériences pilotes ont été effectuées pour explorer les limites de viabilité d'*Halobacterium salinarum* lors d'exposition à différentes températures pour choisir des conditions neutroniques expérimentales stressantes mais non létales. Il en ressort, en comparant la croissance et la viabilité qu'un stress de 55°C pendant 1 heure impacte la croissance cellulaire de manière quasi-équivalente à un stress hypo-salin de 2.5M ; et qu'un stress de 60°C impacte quand à lui d'un niveau équivalent à un stress hypo-salin de 2.0M. Comme pour l'étude de la dynamique moléculaire de *H. salinarum* lors de stress hypo-salin, un contrôle à haute température a été réalisé. Pour réaliser ce contrôle, une culture cellulaire de *H. salinarum* en phase exponentielle (DO 0.9) a été culottée, lavée et déposée sur le porte-échantillon. Une fois le porte échantillon scellé, il est déposé pendant 1 heure dans une étuve à 80°C, puis l'échantillon est mesuré par diffusion neutronique (voir résultats figure 8.19). La cuisson des cellules va engendrer une lyse et une dénaturation des protéines, donc un résultat sur la dynamique moléculaire, similaire à celui obtenu pour l'échantillon 0M, était envisageable. Il est à noter que cette expérience avait déjà été réalisée sur l'organisme mésophile *E. coli* [93] et avait montré une augmentation du MSD et une diminution de la résilience lorsque les cellules étaient cuites.

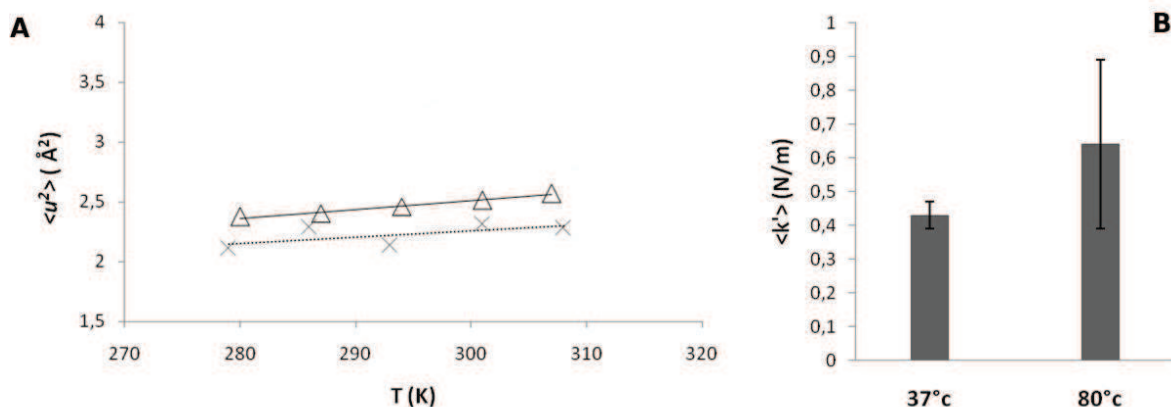


FIGURE 8.19 – **Comparaison de la dynamique moléculaire entre un protéome intact de *H.salinarum* et des cellules lysées de *H.salinarum* par choc thermique.** **A.** Comparaison de la flexibilité du protéome entre *H.salinarum* en conditions normales (triangle) et cellules cuites à 80°C pendant 1 heure (croix). **B.** Comparaison de la résilience du protéome entre *H.salinarum* en conditions normales (4,2M) et *H.salinarum* "cuit" (80°C)

Il est possible de voir que le résultat attendu pour un échantillon cuit n'est pas du tout comparable au contrôle 0M, en effet non seulement la flexibilité est inférieure à l'échantillon normal, mais la rigidité est aussi supérieure aux autres échantillons. Lors de l'ouverture du porte-échantillon dans lequel la cuisson et les mesures de dynamique des cellules ont été réalisées, la vérification de l'aspect du culot (aspect non liquide mais "sec", dont la consistance est comparable à un blanc d'oeuf trop cuit) a permis de conclure que la présence de fortes quantités de sel lors de la cuisson a entraîné l'agrégation de tous les composants des cellules, créant un objet dense et rigide. Cette expérience contrôle ne peut donc servir à la calibration de la dynamique moléculaire du protéome de *H.salinarum* au cours de stress thermique.

Pour l'expérience de diffusion neutronique en présence de stress thermique, les cultures cellulaires ont été transférées à 37°C (contrôle), 55°C ou 60°C pendant 1 heure sous agitation ; puis culottées, lavées dans un tampon de hyper-salin et placées dans le faisceau de neutrons (voir résultats figure 8.20). Notez que, contrairement aux expériences de stress hypo-salin, le stress thermique ne peut pas être maintenu pen-

dant les mesures de diffusion de neutrons, en partie dû à l'utilisation lors de l'expérience de diffusion d'une plage de températures pour le calcul de la résilience.

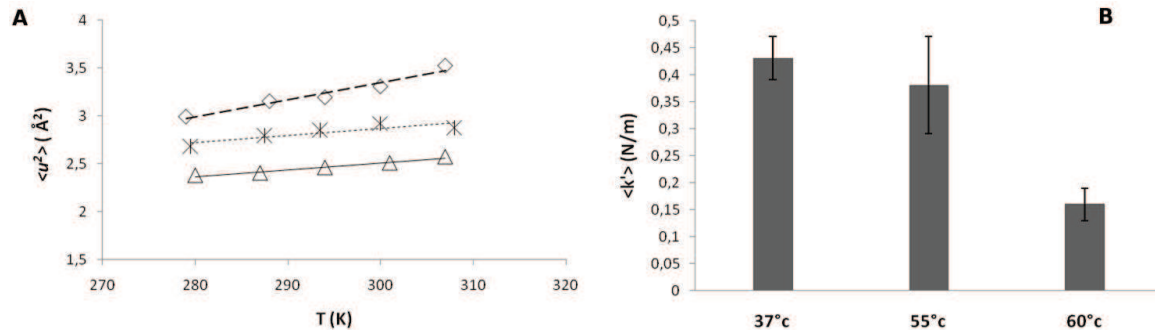


FIGURE 8.20 – **Effets du stress thermique sur la dynamique moléculaire du protéome de *H. salinarum*.** **A.** Déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ en fonction des températures expérimentales, dans la gamme de $0.8 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$ obtenue pour le protéome de l'organisme *H. salinarum* soumis à des conditions de culture en présence d'un stress thermique pendant 1 heure. En triangles *H. salinarum* cultivé en conditions normales (37°C) ; en croix *H. salinarum* soumis à un stress thermique de 55°C pendant 1 heure ; en losanges *H. salinarum* soumis à un stress thermique de 60°C pendant 1 heure. **B.** Histogramme des constantes de force moyennes, décrivant la résilience macromoléculaires, calculées à partir des pentes du déplacement carré moyen de la figure A (les barres d'erreur sont obtenues par la répétition des mesures).

Néanmoins, une nette augmentation de la flexibilité macromoléculaire ainsi qu'une baisse de la rigidité ont été détectées pour les deux échantillons stressés (8.20). En effet plus le stress thermique est important, plus la dynamique moléculaire du protéome est perturbée par rapport à l'échantillon contrôle non stressé. Il est intéressant de constater que malgré ces perturbations importantes, les cellules sont néanmoins toujours vivantes (voir les valeurs de viabilité sur le tableau 8.16). Ceci laisse supposer que des mécanismes mis en jeu au cours de ces stress permettent de compenser les effets délétères d'un stress physique et en particulier pour protéger des effets dénaturant d'un stress thermique prolongé sur le repliement des protéines. L'étude présentée dans le chapitre suivant est en faveur de cette hypothèse.

8.2.5 Etude de l'induction du complexe chaperon TF55 lors des stress

Cette conclusion a été corroborée par l'analyse montrant l'accumulation de la sous-unité alpha thermosome dans les deux types de stress (thermique et hypo-salin) dans la cellule (8.21).

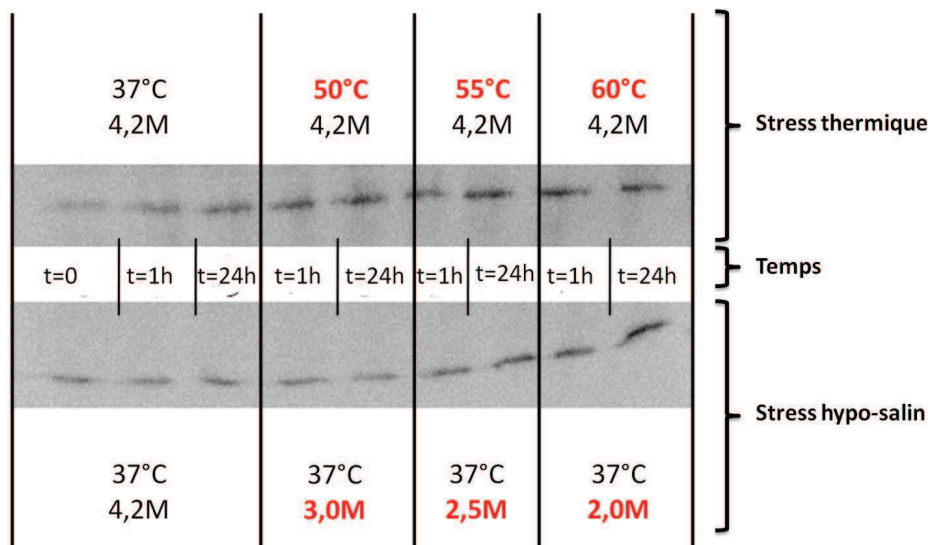


FIGURE 8.21 – Accumulation de la sous-unité α du Thermosome chez *H. salinarum* en fonction des stress environnementaux thermiques (en haut) et hypo-salins (en bas), une fraction de chaque culture soumise ou non aux stress est culottée, les protéines sont extraites et déposée sur un gel SDS, puis transférée sur membrane et révélée avec un anticorps ciblant la sous-unité α du Thermosome

Le thermosome est, chez les archées, l'équivalent de la protéine de choc thermique Hsp60 bactérienne, qui est un complexe chaperon [99]. Cette accumulation est proportionnelle à l'intensité du stress et est présente même pour un stress non thermique comme le stress hypo-salin. Donc les perturbations de la dynamique moléculaire détectées dans les cellules vivantes ont coïncidé avec l'accumulation des protéines de la machinerie du contrôle de la qualité des protéines (protéines chaperonnes). Cette observation pourrait expliquer en partie pourquoi, en dépit d'une perturbation significative du protéome, *Halobacterium salinarum* peut maintenir un taux de viabilité élevé

sur de longues périodes, durant et après l'exposition au stress. Une étude plus poussée, sur les machineries de protection et de dégradation lors de stress, est présentée dans le chapitre III

8.2.6 Influence de l'intégrité cellulaire sur la dynamique du protéome d'un organisme mésophile(*E.coli*) et halophile(*H.salinarum*)

Comme signalé dans le chapitre 8.2.3, il est important de quantifier l'apport des petits solutés à la dynamique moléculaire totale du protéome. Pour cela une culture en conditions normales a été culottée, lavée, puis lysée de façon douce par sonication jusqu'à lyse totale des cellules (observée au microscope). L'échantillon résultant a été divisé en deux, la première partie a directement été introduite dans le porte-échantillon puis la dynamique moléculaire a été mesurée ; la seconde partie a été introduite dans un boudin de dialyse et dialysée pendant la nuit contre un tampon de lavage avec 3,4M KCl de sel, puis la dynamique moléculaire a été mesurée (résultats figure 8.22).

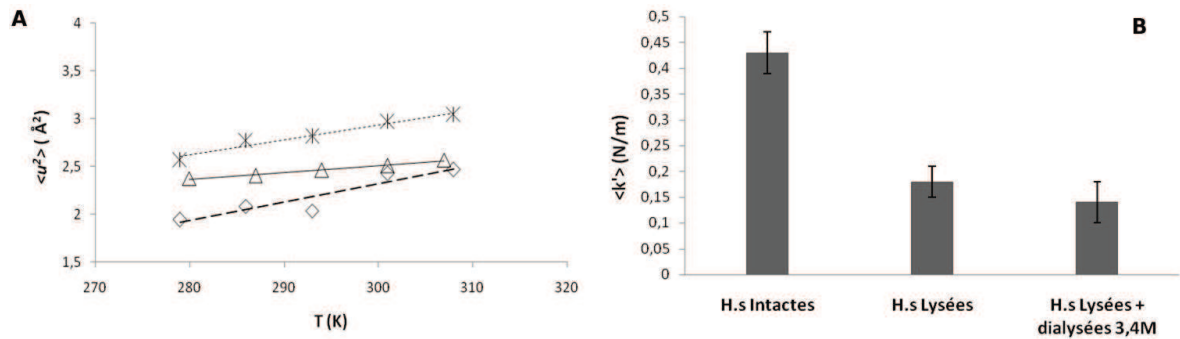


FIGURE 8.22 – Effets de l'intégrité de la membrane et des petits soluté sur la dynamique totale du protéome de *H.salinarum*. **A.** Déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ en fonction des températures expérimentales, dans la gamme de $0.8 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1,7 \text{ \AA}^{-1}$ obtenue pour le protéome de l'organisme *H.salinarum* en conditions normales (triangles), pour des cellules lysées (étoiles) et pour des cellules lysées puis dialysées pendant une nuit contre un tampon à 3,4M KCl (losanges). **B.** Histogramme des constantes de force moyennes, décrivant la résilience macromoléculaire, calculées à partir des pentes du déplacement carré moyen de la figure A (les barres d'erreur sont obtenues par la répétition des mesures).

L'intégrité de la membrane semble importante pour la dynamique moléculaire totale du protéome, en effet les données obtenues sont très différentes de l'échantillon contrôle et les valeurs sont très proches de celles obtenues pour l'échantillon *H.salinarum* stressé à 2,5M. Ce résultat montre aussi l'importance des mesures de dynamique moléculaire réalisées in vivo et montre que l'encombrement moléculaire provoquant des interactions non spécifiques entre les différents composants joue un rôle important dans la dynamique moléculaire du protéome.

Le fait de dialyser l'échantillon fait baisser la flexibilité du protéome assez significativement, par contre la rigidité ne change presque pas. Cette différence de flexibilité peut être due seulement à une "perte" de signal, si beaucoup de petits solutés ont été dialysés alors que l'on met toujours la même quantité de matériel cellulaire dans le porte-échantillon. En conclusion les grands changements de flexibilité et de rigidité observés pour l'échantillon contrôle négatif à 0M NaCl (voir figure 8.14) ne sont pas dus à la perte de composants lors de la dialyse mais à la dénaturation des protéines.

Enfin, lors de la comparaison des résultats obtenus pour des échantillons normaux et des échantillons lysés, nous nous sommes demandé si l'influence de l'intégrité de la membrane est aussi importante chez l'organisme mésophile témoin *E.coli* pour la dynamique moléculaire du protéome. Pour cela, des mesures de dynamique moléculaire de cellules *E.coli* intactes et lysées ont été réalisées (voir résultats figure 8.23). Que ce soit pour les valeurs obtenues pour la flexibilité et la rigidité du protéome, peu de différences sont visibles, que les cellules d'*E.coli* soient lysées ou pas. Cette dernière information renforce les observations faites sur la comparaison des résultats obtenus pour des protéomes intacts de *H.salinarum* et *E.coli* (voir figure 8.13 et laisse aussi penser qu'une partie non négligeable de l'adaptation halophile est due à l'encombrement cellulaire.

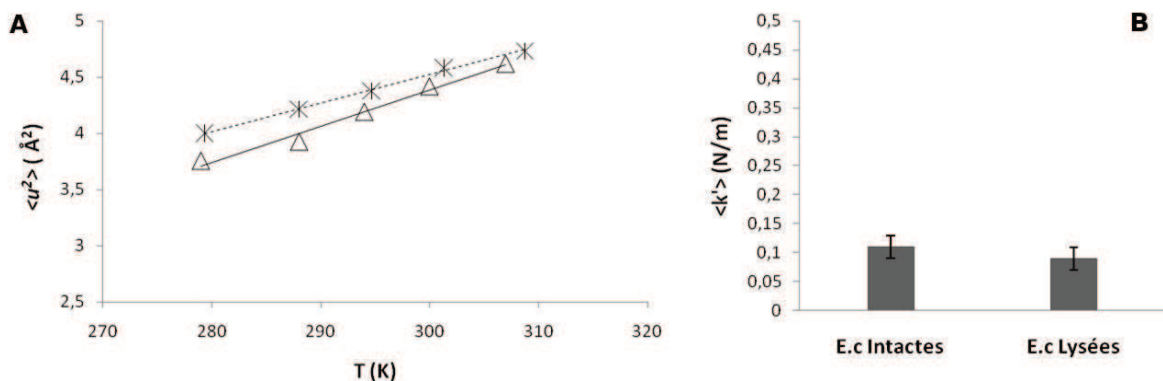


FIGURE 8.23 – Effets de l’intégrité de la membrane et des petits solutés sur la dynamique totale du protéome de *H. salinarum*. **A.** Déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ en fonction des températures expérimentales, dans la gamme de $0.8 \text{ Å}^{-1} < Q < 1.7 \text{ Å}^{-1}$ obtenue pour le protéome de l’organisme *H. salinarum* en conditions normales (triangles), pour des cellules lysées (étoiles) et pour des cellules lysées puis dialysées pendant une nuit contre un tampon à 3,4M KCl (losanges). **B.** Histogramme des constantes de force moyennes, décrivant la résilience macromoléculaires, calculées à partir des pentes du déplacement carré moyen de la figure A (les barres d’erreur sont obtenues par la répétition des mesures).

8.3 Discussion

Notre travail montre que pour les organismes halophiles extrêmes comme *Halobacterium salinarum*, une baisse modérée de la concentration en sel de l’environnement a un effet similaire à un stress thermique sur l’état de repliement des protéines in vivo. Il était déjà connu que, chez les halophiles, une diminution de la concentration en sel de l’environnement induit la transcription et l’accumulation des protéines de réponse au stress comme les chaperons et protéases, certaines d’entre elles étant spécifiques à la réponse au stress salin [100] [101]. Cependant, il est surprenant de détecter des perturbations significatives de la dynamique moléculaire au sein des cellules lorsque les ions K^+ chutent à 2,2M, car c’est encore une forte concentration de sel dans lequel de nombreuses protéines halophiles (comme la malate déshydrogénase) sont stables in vitro pendant de longues périodes dans une solution diluée [101] [102] [78]. Il est à constater qu’une partie du protéome de l’archées halophile extrême *Halobacterium salinarum* est

dépendante d'une concentration élevée en sel afin de maintenir les protéines dans une bonne forme et cela même dans un contexte cytosolique encombré.

Cela a des importantes implications pour la compréhension du mode de vie microbien halophile. Dans la nature, dans des conditions de pluie ou des inondations, ces organismes doivent souvent faire face aux variations brutales de la concentration en sel de l'environnement. Nos résultats ont montré que dans de telles conditions, des effets délétères se produisent déjà sur le protéome *Halobacterium salinarum* même lorsque la concentration en sel externe est encore relativement élevé. Cette constatation tend à laisser penser que ces organismes doivent avoir développé des systèmes efficaces de survie cellulaire pour maintenir un niveau protéome minimal d'intégrité, dans des conditions cellulaires de faibles concentrations en sel.

Dans ce travail, nous avons montré que la spectroscopie de neutrons peut détecter des altérations de l'état moyen de la dynamique moléculaire du protéome au sein d'une cellule vivante en réponse aux changements des conditions extérieures. Ces études pourraient être utiles pour évaluer la robustesse de cellules dans des conditions de stress et pourraient aussi être un outil pour étudier les processus biologiques qui altèrent le repliement des protéines *in vivo*.

La méthode de diffusion des neutrons utilisée pourrait être utile, par exemple dans des applications médicales, pour évaluer l'état de dynamique moléculaire du protéome comme lors d'effets délétères de maladies dégénératives, du vieillissement, sur les cellules cultivées ou des échantillons de tissus.

Chapitre 9

Mise en évidence d'un mécanisme de survie à la basse salinité chez *Halobacterium salinarum*

Halobacterium salinarum est un organisme hyper-halophile. Dans le chapitre précédent, il a été possible de voir une "résistance" du protéome vis-à-vis d'une chute drastique de la concentration en sel intracellulaire, due elle-même à une chute de la concentration en sel extracellulaire. Il est fort probable que de nombreux mécanismes soient mis en jeu au cours de ces stress pour protéger le protéome et donc la cellule.

Dans cette optique, nous avons voulu étudier les limites de tolérance de l'organisme *H. salinarum* aux stress hypo-salins. Il est connu que lors d'une diminution rapide de la concentration en sel extracellulaire, cet organisme est lysé du fait de la pression osmotique engendrée par la différence des concentrations extracellulaire et intracellulaire en sel [103]. Ainsi, lors d'une chute brutale de la concentration en sel, en dessous de 1.5M, toutes les cellules "explosent". La pression osmotique va engendrer une entrée massive et rapide d'eau à l'intérieur de la cellule, provoquant un gonflement de la cellule et une rupture de la membrane. Cette propriété est largement utilisée pour lyser ces cellules par de nombreux groupes de recherche [103] .

La figure 9.1 montre les courbes de croissance de cultures de Hs soumises à différentes

concentrations salines extracellulaires par dilution avec un milieu sans NaCl (le nombre de cellules a été normalisé par les facteurs de dilution). Il est possible de voir qu'en dessous de 2.5M NaCl extracellulaire les cultures s'arrêtent de croître et qu'en dessous de 2.0M la DO chute fortement (résultat d'une disparition des cellules due à leur lyse).

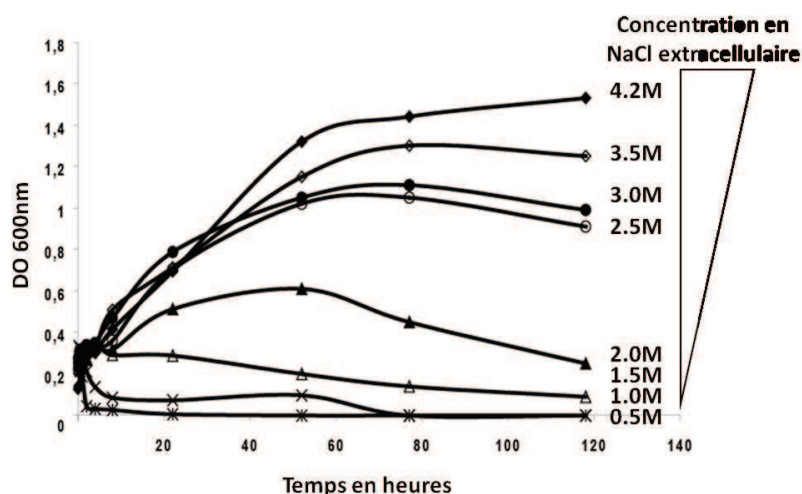


FIGURE 9.1 – Effet d'une dilution avec un tampon sans sel sur une culture de *H. salinarum* : Une culture à 4.2M à $t=0$ est fractionnée puis chaque fraction est diluée avec du milieu de croissance sans NaCl afin d'obtenir des cultures dans un milieu à 4.2M NaCl extracellulaire (losanges noirs) ; à 3.5M NaCl extracellulaire (losanges blancs) ; à 3.0M NaCl extracellulaire (ronds noirs) ; à 2.5M NaCl extracellulaire (ronds blancs) ; à 2.0M NaCl extracellulaire (triangles noirs) ; à 1.5M NaCl extracellulaire (triangles blancs) ; à 1.0M NaCl extracellulaire (croix) ; à 0.5M NaCl extracellulaire (étoiles)

Il est intéressant d'étudier ces mécanismes d'adaptation à la basse salinité car dans son milieu naturel, l'environnement salin de cet organisme peut complètement changer, comme par exemple lors de fortes pluies. Par ailleurs, des études font état de la présence d'organismes halophiles dans des milieux non hyper-salins, comme dans le sol, l'intestin d'animaux [104], le désert, ... ainsi que dans des cristaux de sel [105] sur des poissons [106] ou dans des mines [107].

Cet organisme, pour survivre dans de telles situations, utilise-t-il des techniques d'évitement ou a-t-il des propriétés d'adaptation permettant sa survie ? De plus, la limitation d'une concentration extérieure, supérieure à 1.5M pour sa survie, ne permet pas à cet orga-

nisme de ce disséminer facilement et ne devrait pas permettre de retrouver cet organisme dans des milieux non hyper-salins.

Pour répondre à ces questions, nous avons testé différentes techniques de dilution, afin de voir si l'application de stress hypo-salins "moins rapides" mais ayant une "intensité" supérieure à celle de 1,5M permettait d'augmenter la limite de tolérance au stress hypo-salin et donc une survie dans des conditions non hyper-salines.

Pour cela, nous avons mis au point un système expérimental, décrit sur la figure 9.2, permettant de contrôler la vitesse de l'ajout de solution non salée aux cultures. Ainsi nous pouvons effectuer une dilution très progressive pour laisser le temps à l'organisme de mettre en œuvre ses systèmes de protection.

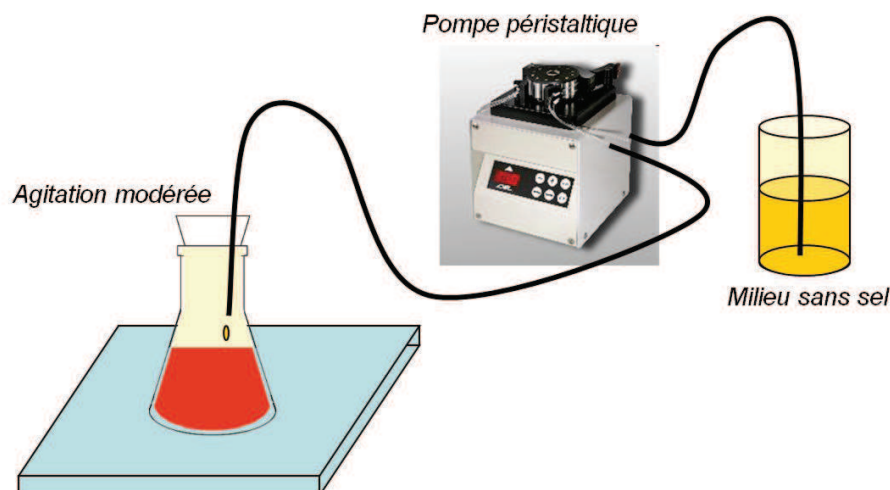


FIGURE 9.2 – Système expérimental permettant une dilution progressive : Système expérimental permettant de réguler la vitesse de dilution par le biais d'une pompe péristaltique d'une culture avec un milieu de culture sans NaCl et donc d'obtenir un stress dont la progressivité est contrôlée.

9.1 Résultats

9.1.1 *Halobacterium salinarum* peut survivre à des conditions hypo-salines extracellulaires

Grâce au système décrit dans le chapitre précédent (figure 9.2), il a été possible de contrôler la vitesse de dilution des cultures et donc la progressivité du stress.

Nous avons essayé plusieurs vitesses de dilution pour passer de 4.2M à 0.5M : 2 jours / 5 jours que nous avons comparé à une dilution par ajout en 10 étapes de forts volumes de milieu sans sel, le tout, fait en 1 heure ou en 2 jours. Le dispositif expérimental ne permet pas de réaliser en même temps toutes ces techniques de dilution et donc il n'est pas possible de réaliser ces expériences sur une même culture. De ce fait il est important d'essayer de travailler avec des cultures aux propriétés similaires (même DO, même vitesse de division, même aspect des cellules).

Aux cours des stress, un comptage du nombre de cellules (par microscopie sur lame de Neubauer, voir 13.2.3)), ainsi qu'une mesure du taux de mortalité (coloration des cellules vivantes et des cellules mortes par les composants du kit Live/Dead d'Invitrogen et révélées par microscopie fluorescence, voir 13.2.4) a été effectuée à chaque diminution de 0.5M de la concentration totale en NaCl de la culture (figure 9.4).

Au cours des mesures de viabilité avec le kit Live/Dead, qui colore en vert les cellules vivantes et en rouge les cellules mortes, très peu de cellules mortes ont été observées (moins de 5%) quelque soit l'intensité du stress (exemple de résultats obtenue par la coloration live dead voir figure 9.3).

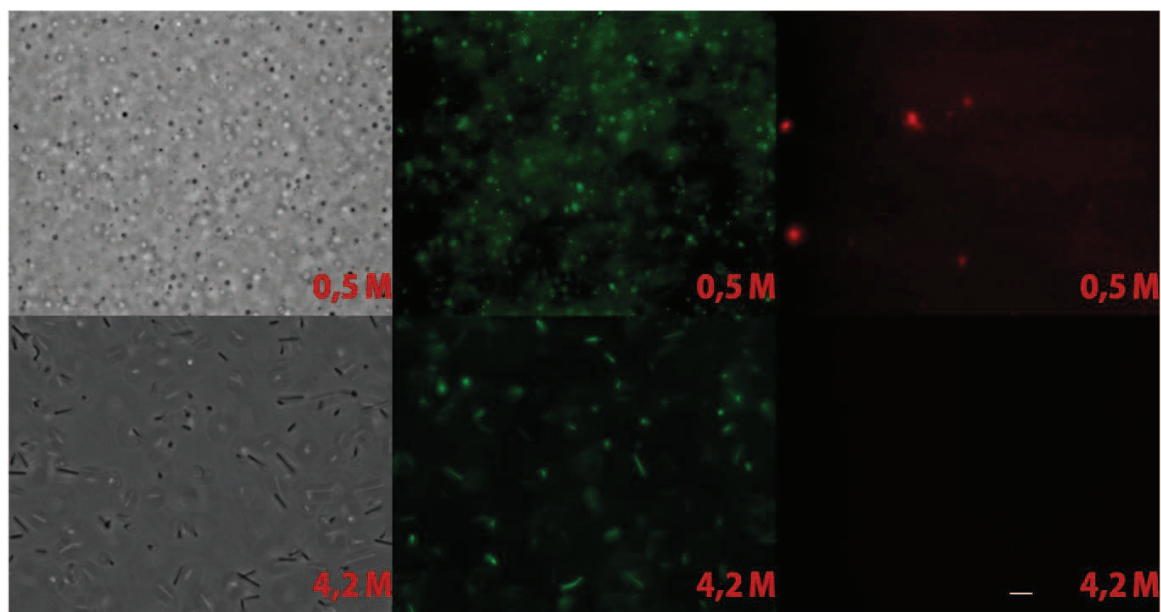


FIGURE 9.3 – Micrographies de cellules d'*H.salinarum* en condition de croissance normale (4,2M) et soumis en fin d'un stress progressif de 5 jours (concentration extracellulaire en NaCL = 0,5M.) Les cellules ont été incubées avec le kit Live/dead d'Invitrogène pendant 15 minutes dans l'obscurité, la coloration "verte" marque toute les cellules, la coloration "rouge" marque uniquement les cellules mortes. La barre blanche correspond à une échelle de $10\mu m$.

Le kit Live/Dead d'Invitrogène est composé d'intercalants fluorogéniques de l'ADN, qui vont pénétrer de différentes façons dans la cellule : le colorant vert passe les membranes librement et va donc s'intercaler et coloré toutes les cellules ; le colorant rouge ne peut passer que les membranes non intactes (signe de mortalité cellulaire) et donc ne colore que des cellules aux parois endommagées (pour plus de précisions, voir le chapitre Matériel et Méthodes). Cette valeur de mortalité mesurée par le biais du kit Invitrogène ne correspond pas à la viabilité réelle des cellules stressées, en effet les cellules qui ne résistent pas au choc osmotique vont exploser pour la plupart, ne seront pas visibles en microscopie et donc par coloration Live/Dead. Pour visualiser la quantité de cellules survivantes, il vaut donc mieux regarder la fluctuation du nombre de cellules totales dans chaque culture et normaliser ce résultat par les mesures de viabilité avec le test Live/Dead. Enfin il est à noter que la "viabilité" mesurée ne correspond pas à la survie dans la gamme de concentration en sel extracellulaire comprise entre 4.2M

et 2.0M, car il faut plus d'1 jour (sauf pour la descente en étape en 1 heure) pour arriver à une concentration en sel du milieu proche de 2.0M et pendant cette période il y a encore une croissance cellulaire et/ou un turn-over supérieur à 1. En dessous de 2.0M nous pouvons estimer que nous observons bien directement la viabilité des cellules survivantes au stress, vu que normalement la croissance est complètement stoppée.

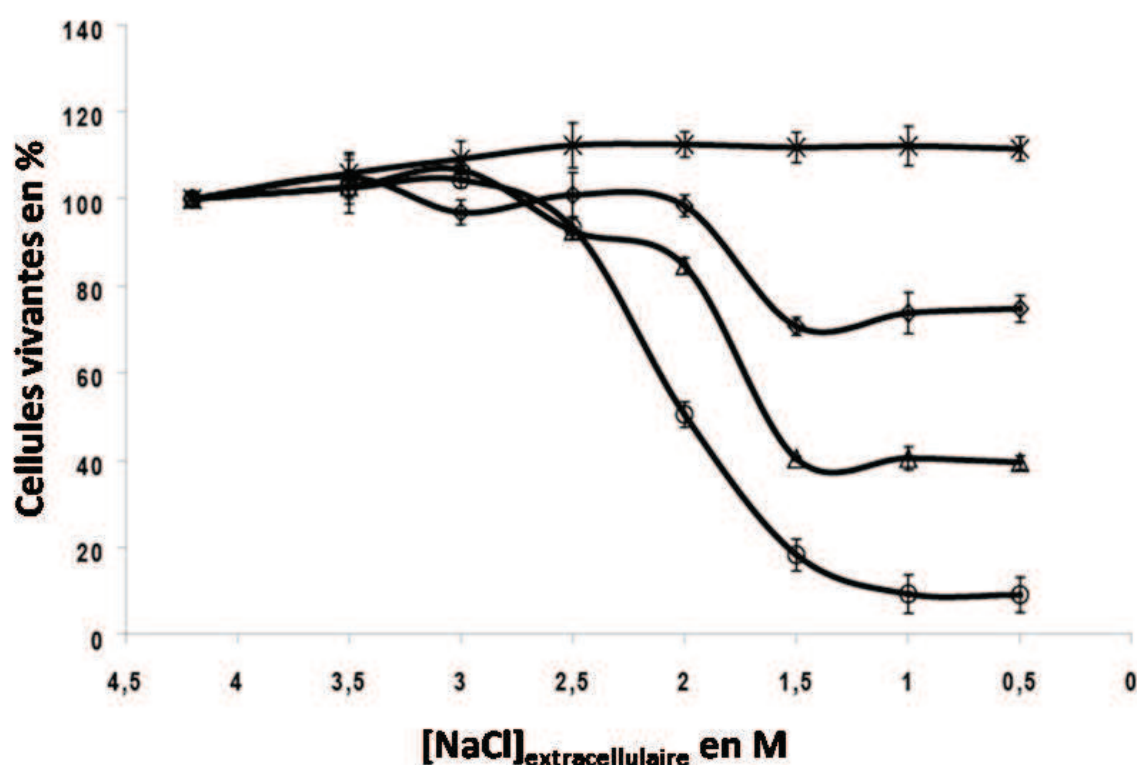


FIGURE 9.4 – Viabilité de *H.salinarum* lors du passage de 4.2M à 0.5M en fonction de la vitesse de dilution des cultures avec un tampon sans sel : cette mesure de viabilité met en jeu le nombre de cellule compté par microscopie, ainsi que les résultats obtenus par le test Live/Dead sur les cellules. Les courbes correspondent à une dilution en 1 heure par ajout de 10 volumes de milieu 0M NaCl (ronds) ; à une dilution en 2 jours par ajout de 10 volumes de milieu 0M NaCl (triangles) ; à une dilution progressive en 2 jours avec la pompe péristaltique (losanges) ; à une dilution progressive en 5 jours avec la pompe péristaltique (croix)

Nous pouvons ainsi voir que le taux de survie des cellules dépend du temps qui leur est laissé pour s'adapter et non de l'intensité finale du stress (voir figure 9.4). Pour des

dilution par 10 ajout successif de volume de tampon sans sel, il est possible de voir une très forte mortalité quand la concentration en NaCl du milieu passe en dessous de 2.0M, par contre il est possible d'observer que plus la vitesse de dilution est lente plus le nombre de "survivant" augmente. Ainsi, il est possible d'obtenir une "viabilité" finale proche de 100% à une concentration de 0.5M, pour une dilution très progressive de 5 jours.

En prenant en compte le fait que lors des premiers jours il y a eu des divisions cellulaires (la croissance ne s'arrête pas et le *turn over* est supérieur à 1), la valeur de "viabilité" obtenue proche de 100% n'est pas réelle si on en se fie uniquement au nombre de cellules, il serait plus exact d'estimer que la survie au stress est de l'ordre de 80% en fin d'expérience.

Des études de "redémarrage" ont été réalisées en milieu liquide et en milieu solide. L'étude n'étant pas complète et peu répétée, aucune figure de résultats n'est montrée dans ce document. En milieu liquide, nous ajoutons progressivement du sel au milieu jusqu'à une concentration en NaCl extracellulaire de 4,2M. Nous avons testé de "redémarrer" des cellules stressées aux différentes "concentrations étapes", soit 3,5M-3,0M-2,5M-2,0M-1,5M-1,0M-0,5M. Il est à noter que dans tous les cas, nous avons observé un redémarrage de la croissance cellulaire, mais que plus le stress était intense (plus la concentration en sel était basse), plus le redémarrage était lent, avec un temps de latence de quelques jours pour un redémarrage à 1,0M et de plusieurs semaines pour un redémarrage à 0,5M.

Pour étudier le redémarrage en milieu solide, il a fallu contourner le problème du choc osmotique dû à l'étalement sur un milieu solide riche en sel. Pour cela un système d'augmentation de la concentration en sel progressif en milieu solide a été testé :

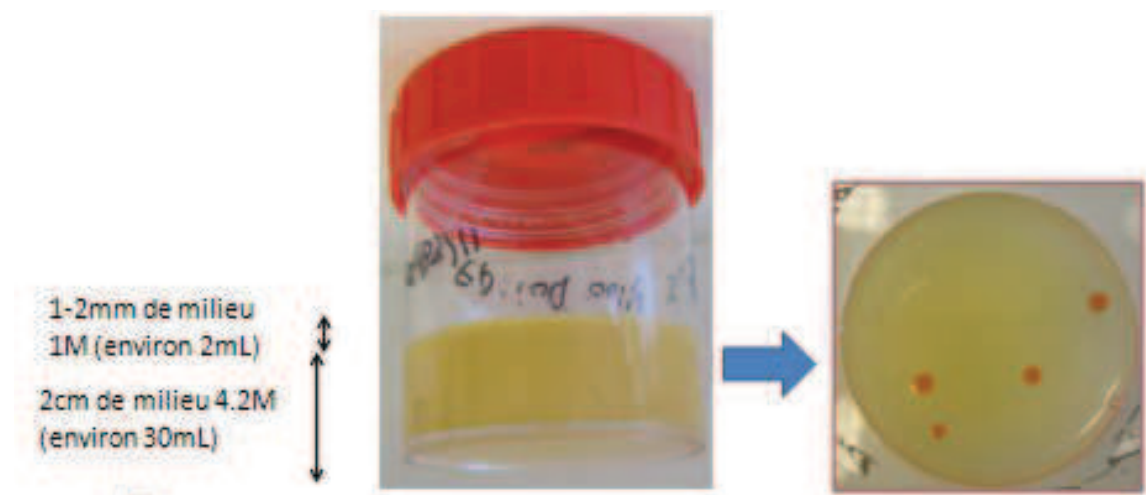


FIGURE 9.5 – **Système de milieu solide pour étaler des cellules adaptées :** à gauche et au centre, explication des différentes couches du milieu solide ; à droite, colonies de cultures d'*H.salinarum* préalablement soumises à un stress basse salinité de 0,5M NaCl extracellulaire.

Avec ce genre de milieu solide formé de couches de différentes concentrations en sel, il est possible d'étaler des cellules stressées sur un environnement similaire en sel à leur milieu environnant. Les milieux solides ne sont pas figés : il va y avoir un équilibre progressif en sel entre les différentes couches au cours du temps, laissant ainsi le temps aux cellules de "s'adapter" aux nouvelles conditions environnementales et en limitant ainsi le choc osmotique.

Pour l'instant, seule cette expérience, de redémarrage de culture à 0,5M a été réalisée et doit être reproduite ; de plus il est à noter que les premières colonies sont apparues 4 semaines après étalement.

Jusqu'à présent, il était de notoriété publique que l'organisme *H.salinarum*, ne pouvait survivre dans des conditions salines extracellulaires inférieures à 2,0M [103] [37] [108]. Nous démontrons, ici que cet organisme a la capacité de survivre en présence de faibles concentrations salines et qu'il est "capable" de recommencer à croître si la concentration saline du milieu redevient optimale pour lui.

Dans le chapitre précédent (voir figure 8.16), nous avons pu observer une chute de la

concentration intracellulaire en K^+ lors de baisses des concentrations extracellulaires en NaCl, qui engendraient une perturbation de la dynamique du protéome. Il devient intéressant de mesurer la concentration intracellulaire en K^+ dans ces conditions hypo-salines "extrêmes".

9.1.2 Mesure de la concentration intracellulaire en K^+ au cours de stress hypo-salins progressifs.

Nous avons mesuré la concentration en K^+ dans nos cellules au cours du phénomène d'adaptation morphologique au stress hypo-salin.

Pour cela, des fractions de cellules ont été prélevées au cours du stress progressif de 5 jours par pallier de 0,5M NaCl du milieu de culture (soit 4,2M-3,5M-3,0M-2,5M-2,0M-1,5M-1,0M-0,5M), ainsi que pour une culture soumise à un stress par ajout successif de milieu non salé pendant 1 heure. Les échantillons prélevés sont ensuite fractionnés en fractions de 1mL, culottés, lavés avec un tampon sans KCl, puis transférés dans 10mL d' H_2O distillé, soniqué et le K^+ est mesuré par spectrophotometrie de flamme (ICP) (résultat figure 9.6).

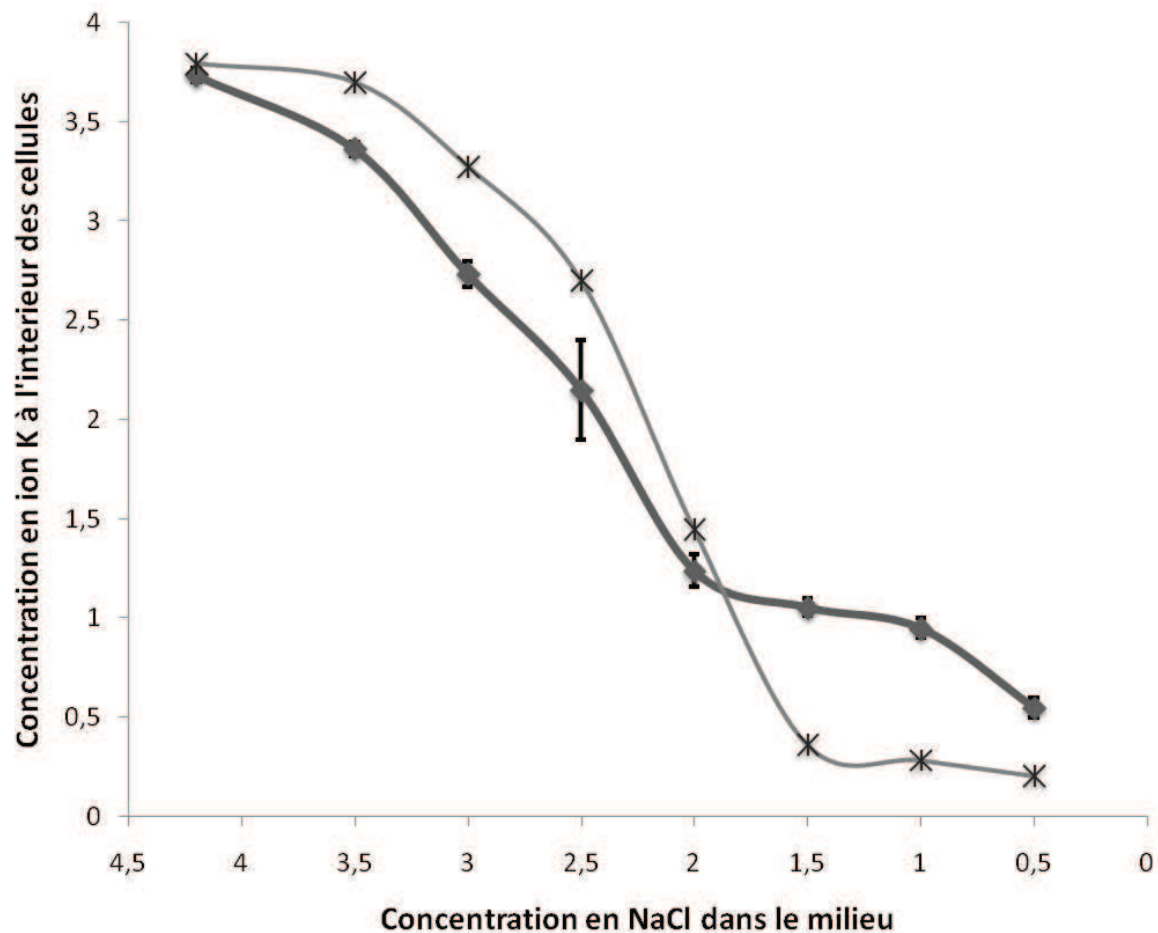


FIGURE 9.6 – Suivi de la concentration en K^+ à l'intérieur du cytoplasme au cours d'un stress bas sel : au cours d'un stress progressif (carrés + trait gras) et au cours d'un stress par étape en 1 heure (étoiles + trait fin). Mesure effectuée par spectrométrie de flamme.

Bien que nous ne soyons pas dans les mêmes conditions de stress hypo-salin, il est à noter que nos mesures d' K^+ intracellulaires sont proches de celles de la littérature [37]. Nous pouvons voir que jusqu'à 2,5M d'NaCl extracellulaire (concentration où l'organisme arrive encore à croître), il y a une légère rétention de la concentration en K^+ , l'effet de rétention est encore plus visible sur les mesures de concentration pour le stress par étape (trait fin figure 9.6). Cette différence de rétention du K^+ entre les deux expériences pourrait s'expliquer par le fait que nous avons laissé très peu de temps de latence pour le stress par "étape" entre la dilution (donc le début du stress) et

l'échantillonnage (fin du stress). Il est à noter que dans cette gamme de concentration, c'est à dire supérieure à 2,5M la majorité des protéines restent encore stables [29] [31]. Par contre en dessous de 2M de NaCl extracellulaire la concentration en K^+ chute pour les deux systèmes expérimentaux, de plus il est à rappeler que ces conditions sont susceptibles de perturber l'intégrité du protéome. Dans ce cas, les cellules n'arrivent pas à maintenir une concentration optimale en K^+ interne en dessous de 2M NaCl extracellulaire. On peut supposer que l'activité des pompes à K^+ n'est pas suffisante pour contrer les effets de la pression osmotique engendrée par ce type de stress ou que la faible concentration en K^+ provoque des dénaturations de nombreuses protéines qui empêche la cellule de fonctionner normalement et donc de maintenir le sel dans son cytoplasme. Une autre option serait pour ces cellules d'évacuer le K^+ interne afin d'éviter la destruction de leur paroi par la pression osmotique. Cette dernière hypothèse pourrais être en accord avec l'observation suivante : pour le stress par étape en 1 heure à partir de 1,5M NaCl du milieu, la majorité des cellules sont lysés et on obtient donc une mesure du K^+ proche de 0.

Etant donné la forte baisse de salinité intracellulaire, l'ensemble du protéome doit être soumis à de fortes perturbations (voir le chapitre 8). Ces basses concentrations en sel intracellulaire devraient provoquer la dénaturation de la majorité des protéines halophiles, ce qui entrainerais une grande toxicité cytoplasmique et qui devrait donc être létal pour l'organisme. Or, comme vu précédemment par les mesures de viabilité ce n'est pas le cas : une majorité de cellules "survive" et recommence à croître lorsque la concentration en sel redevient favorable. Des mécanismes de protections du protéome doivent donc être mis en jeux pour contrer cette baisse de salinité intracellulaire et permettre la survie des cellules.

9.1.3 La survie des cellules en condition de basse salinité s'accompagne de changement morphologiques

Au cours des différents comptages de cellules et de tests de viabilité, il a été possible d'observer que les cellules d'*Halobacterium salinarum*, ayant normalement une forme de bâtonnet, se transformaient en cellules sphériques lors de stress basse salinité (figure 9.7). Il est à noter que cette transformation avait déjà été observée [103], mais pas analysée et mise en rapport avec une survie en conditions hypo-salines.

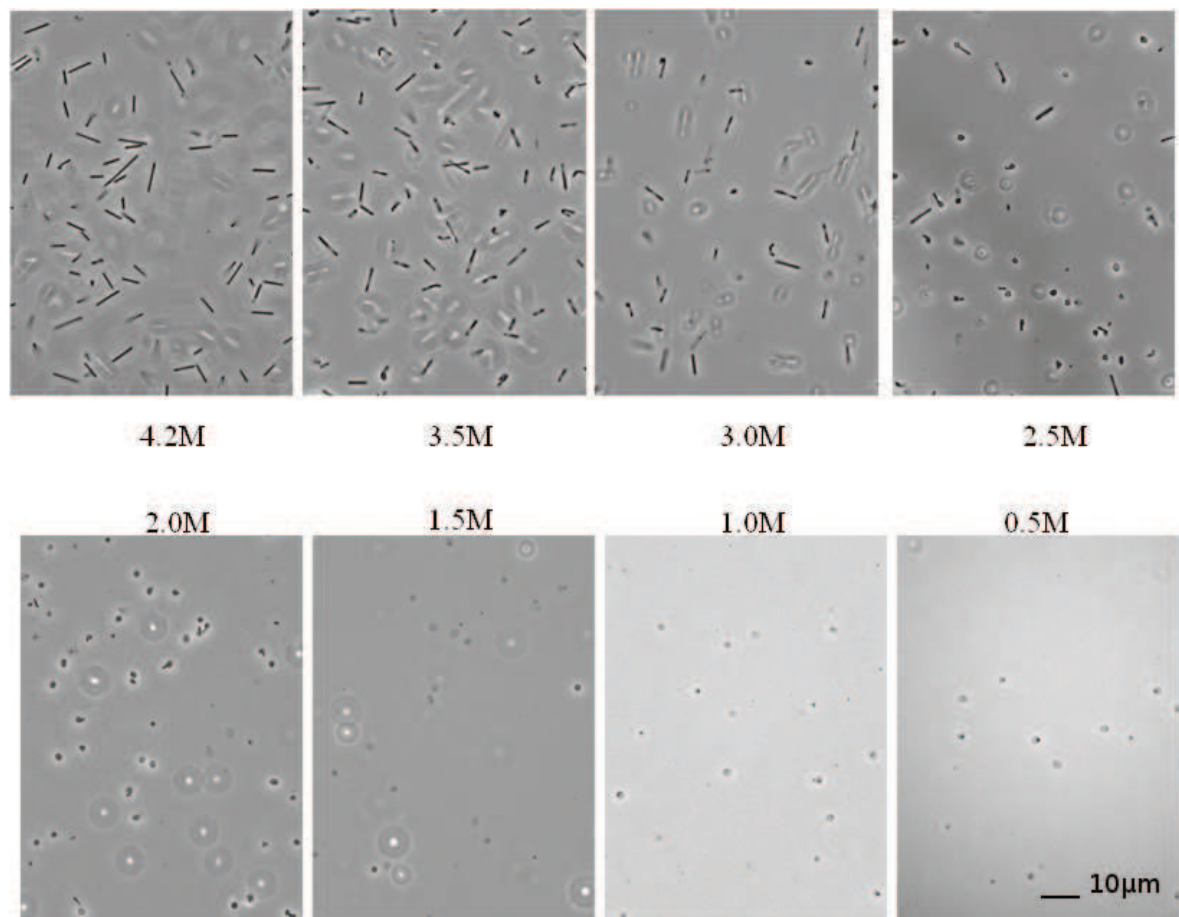


FIGURE 9.7 – Comparaison de la forme des cellules d'*Halobacterium salinarum* à différentes concentrations extracellulaires de NaCl. Les stress sont appliqués par dilutions progressives avec un milieu sans sel pendant un total de 5 jours (pour passer de 4,2M à 0,5M) à l'aide d'une pompe péristaltique. Micrographies par contraste de phase.

Les cellules ont une forme de bâtonnet en condition normale (4,2M de NaCl extracellulaire) et cela jusqu'à environ 2,5M.

Puis il est possible de voir qu'à partir de 2,5M, un changement drastique de forme des cellules s'effectue : les cellules rétrécissent et deviennent globulaires. Il est à noter que nous avons pu observer que des cellules à 3,0M conservent leur forme de bâtonnet et cela pendant plus de 3 jours (nous n'avons pas observé leur forme après ce laps de temps).

Le changement morphologique observé des cellules de la forme en bâtonnet vers une forme sphérique "résistante à la basse salinité", pouvait s'apparenter à une forme de sporulation.

La sporulation est un mécanisme utilisé par certaines bactéries pour "survivre" (conserver une ou plusieurs copies de l'ADN) lors d'un stress létal pour l'organisme [109], la forme spore étant une forme de latence capable de résister à de nombreux stress. La formation de la pré-spore commence par le dédoublement du chromosome, puis par l'arrangement du matériel nucléaire en forme de bâtonnet axial. Ensuite, un septum (cloison membranaire) transversal asymétrique se forme à partir de la membrane plasmique [109].

Pour identifier, si notre phénomène de transformation est une sporulation ou non, la coloration des membranes cellulaires (colorant FM 4-64, voir 15.1.1) va permettre d'observer l'apparition du septum lors du phénomène.

Pour visualiser cela, il est possible de suivre en temps réel l'application du stress bas sel sur une cellule et ainsi "assister" à son changement de forme, par microscopie par contraste de phase et par fluorescence. Pour cela, un échantillon de culture cellulaire est déposé entre lame et lamelle de microscopie et est observé au microscope. Pendant l'observation, il est possible d'injecter du milieu sans sel entre la lame et la lamelle, provoquant ainsi une diminution rapide de la concentration en sel. Le changement de forme dépendant de la concentration en sel extracellulaire, il est possible d'observer en direct et en quelques minutes le changement de forme des cellules d'*H.salinarum* préalablement incubées avec du colorant FM4-64 (résultat figure 9.8). Il est à noter que

ce genre d'expérience ne permet pas de contrôler exactement la concentration en sel du milieu et le résultats présenté correspond donc à une simulation de chocs hypo-salins. Si l'ajout de tampon sans sel est trop important, cela peut provoquer la lyse immédiate de toutes les cellules.

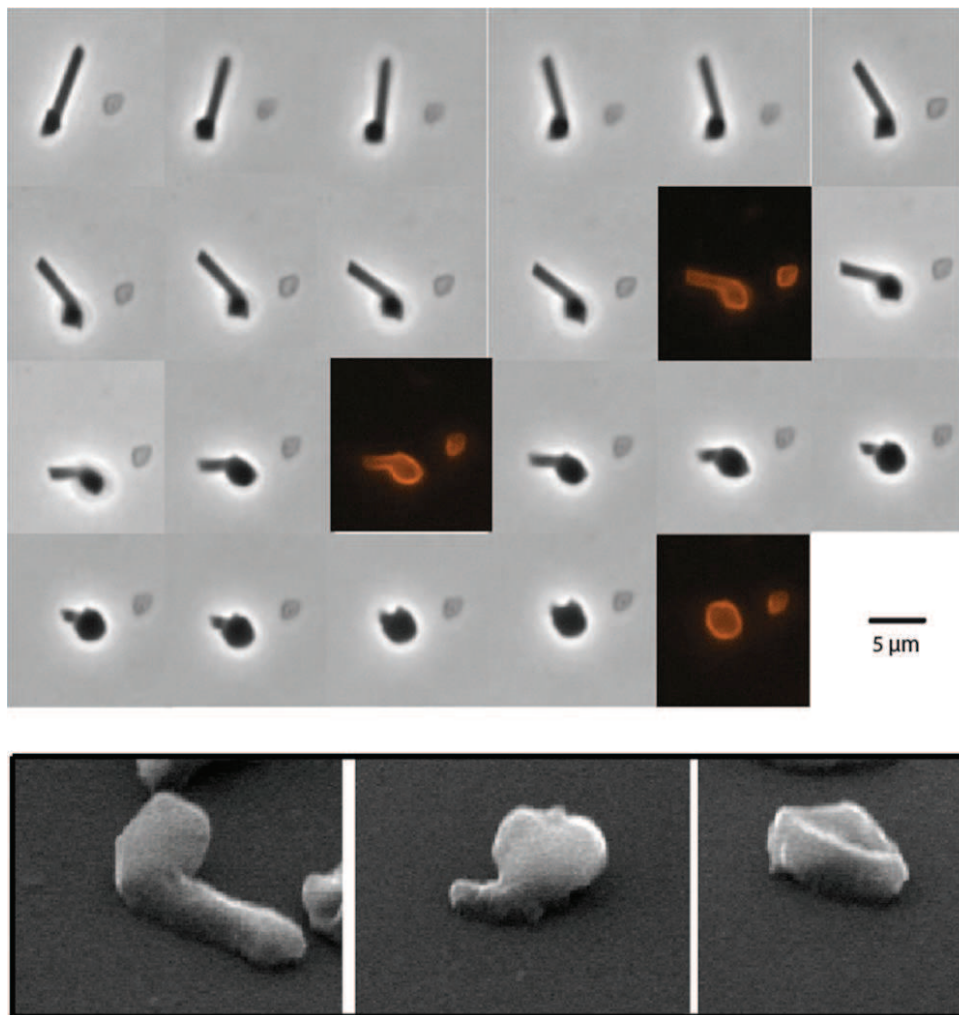


FIGURE 9.8 – **Changement morphologique au cours d'un stress bas sel visualisé en temps réel.** **En haut :** photographies des étapes de transformation d'une cellule d'*Halobacterium salinarum* au microscope photonique, le colorant orange FM 4-64 a été utilisé pour colorer la membrane. **En bas :** micrographie réalisée par microscopie électronique par balayage de cellule d'*Halobacterium salinarum* en cours de transformation, dont la forme est comparable à celle observée en "temps réel" au microscope photonique.

Le fait de ne pas voir le septum par le changement morphologique en temps réel permet d'exclure le mécanisme de sporulation.

Il s'agit d'un phénomène dynamique dépendant de la concentration en sel. En comparant l'observation du changement morphologique en temps réel et la forme des cellules "adaptées" aux différentes concentrations extracellulaires en NaCl, il est possible de décrire ce phénomène :

A 3,0M NaCl extracellulaires, on distingue nettement la forme d'une coque à une extrémité du bâtonnet. Puis, plus on baisse la concentration extracellulaire en sel, plus la partie bâtonnet de la cellule se raccourcit et la zone sphérique augmente. À 1,5M NaCl extracellulaire, 80% des cellules ont une forme ovoïdale. A partir de 1,0M NaCl extracellulaire, les cellules sont toutes rondes.

De plus, si nous ré-incubons ces cellules en forme de "spore" dans un milieu optimum, la croissance recommence au bout de 3 semaines environ (expérience réalisée en milieu liquide et en milieu solide voir figure 9.5).

Nous sommes en présence d'un nouveau phénomène de survie cellulaire.

Pour analyser ces changements de forme plus en détail, l'utilisation d'un microscope par contraste de phase n'est pas suffisant. Avec la collaboration de D.Phenel et G.Schoehn du laboratoire de Microscopie Electronique et Méthodes de l'IBS , il a été possible de visualiser les différentes formes des cellules soumises au stress bas sel, par microscopie électronique par coloration négative, par coupe et par balayage.

Remarque : toutes les expériences de microscopie électronique ont été réalisées sur des cultures adaptées à une concentration en sel extracellulaire de 1M au minimum. L'obtention de cellules stables à 0.5M pour la microscopie (pouvant subir des centrifugations, ainsi que tous les traitements pour fixer les cellules) a été un aspect du sujet de stage de Camille Cibot (étudiante en Master 2), des problèmes de cristallisation (formation de cristaux autour des membranes) sont apparus et ont rendu ses observations peu fiables. Ces observations doivent être encore reproduites et ne sont donc pas traitées dans cette thèse. Nous comparons ici uniquement des cellules en conditions

normales avec des cellules en conditions de stress bas sel à 1M.

Donc pour compléter les observations faites en microscopie par contraste de phase, les cellules ont aussi été observées en microscopie à transmission afin d'obtenir une meilleure résolution de l'observation. En effet cette technique permet d'obtenir un grossissement d'observation 500 fois supérieur à celui de la microscopie par contraste de phase.

L'observation des cellules par la microscopie à balayage va quand à elle permettre une analyse plus fine des cellules en trois dimensions, pour une meilleure visualisation de leurs surfaces.

L'observation des coupes de *Halobacterium salinarum* par Microscopie électronique en transmission, permet d'obtenir des informations sur l'épaisseur des parois cellulaires et des informations sur la densité du cytosol.

Pour réaliser les expériences de microscopie électronique par coloration négative, des cellules cultivées en conditions normales ou soumises à un stress hypo-salin (1M NaCl extracellulaire) sont fixées avec du formaldéhyde (4%) et du glutaraldéhyde (2,5%), pendant une nuit, sous agitation à 4°C. Une partie des cellules fixées sont déposés sur une grille de mica recouverte de carbone, puis l'échantillon est coloré négativement avec de l'acétate d'uranyle. L'échantillon peut ensuite être visualisé en microscopie électronique avec le "Microscope Philips CM12" (voir résultats figure 9.9).

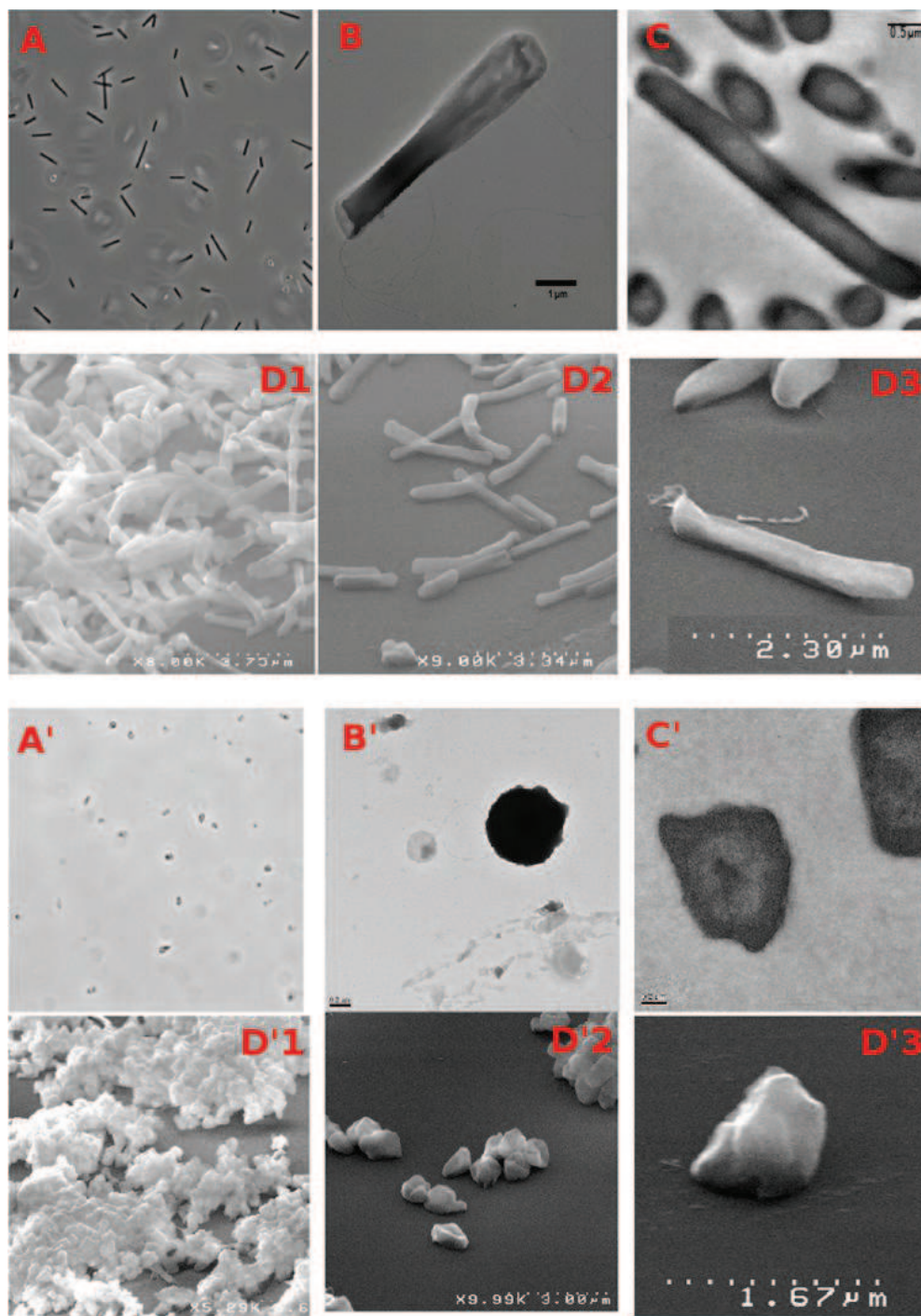


FIGURE 9.9 – **Comparaison des cellules en conditions normales et après un stress bas sel (1M) par microscopie** : par microscopie par contraste de phase (A et A'), microscopie électronique à coloration négative (B et B'), microscopie électronique en coupe de résine (C et C') et microscopie électronique à balayage (D1/D2/D3 et D'1/D'2/D'3). La microscopie électronique a été réalisée par Daphna Fenel du laboratoire de Microscopie Electronique et Méthodes de l'IBS.

Pour réaliser les expériences de microscopie électronique par transmission de coupe, les cellules cultivées en conditions normales ou soumises à un stress hypo-salin (1M NaCl extracellulaire) sont fixées cette fois-ci avec du paraformaldéhyde (1%) et du glutaraldéhyde (1,25%), pendant 4h à température ambiante. Puis une autre série de fixation est réalisée avec du tetroxide d'osmium, puis avec de l'acide uranyle. Enfin l'échantillon est déshydraté à l'éthanol, puis incubé avec de la résine pendant 48h. Ensuite des coupes ultra-fines des cellules prisonnières de la résine sont réalisées à l'aide d'un microtome. Enfin une coloration à l'acétate d'uranyle est réalisée afin de visualiser les coupes cellulaires par le biais d'un microscope électronique (voir résultats figure 9.9).

Pour réaliser les expériences de microscopie électronique balayage, on sèche directement les culots cellulaires sur une plaque de silicium. Puis on métallise l'échantillon par l'ajout d'une couche de platine, avant de pouvoir le visualiser (voir résultats figure 9.9).

Ces expériences de microscopie électronique permette d'estimer plus précisément les différentes formes des cellules d'*H.salinarum*. En condition normale la majorité des cellules ont une forme de bâtonnet (9.9 D1) de 3 et 10 μm de long et environ 0.45 à 0.65 μm de large (9.9 B, D2 et D3). Le cytosol de ces cellules apparaît dense aux électrons (9.9 C).

En conditions de stress, la majorité des cellules ((9.9 D'1) ont une forme ovoïdale, d'environ 1 μm de diamètre (9.9 B', D'2 et D'3), nous pouvons remarquer que ces formes adaptées n'ont pas une forme cylindrique parfaite. Nous pouvons ainsi voir que dans ces conditions de stress, le cytosol reste dense aux électrons(9.9 C'), mais aussi qu'il n'y a pas d'épaississement de la membrane.

9.1.4 Mise en évidence d'une nouvelle forme d'adaptation au stress.

Comparaison du volume cellulaire et de la surface de la membrane des différentes formes morphologiques de *H.salinarum*.

En analysant des photographies de microscopie par contraste de phase et en utilisant le logiciel ImageJ il est possible de comparer le volume et la surface moyenne des cellules normales et stressées (figure 9.10). Pour les cellules en forme de bâtonnet, nous estimons que leur forme est proche du cylindre et pour les cellules ovoïde, proche de la sphère.

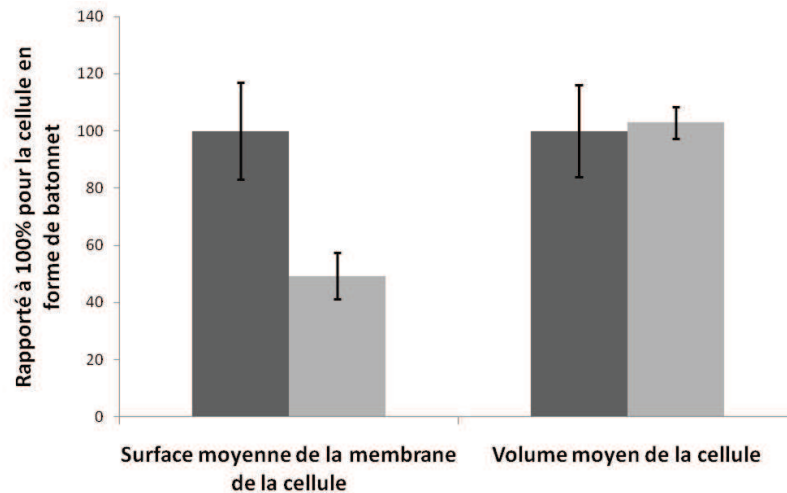


FIGURE 9.10 – Comparaison de la surface de la membrane et du volume de la cellule en forme bâtonnet (gris foncé) et en forme de sphère (gris clair). Pour le calcul des cellules, 200 cellules en conditions normales et stressées ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ sur des micrographies par contraste de phase. Il a été estimé pour simplifier les calculs que la forme de bâtonnet correspondait à un cylindre et la forme ovoïde à une sphère.

Il est possible d'observer lors de ce changement morphologique, qu'il n'y a pas de gonflement de la cellule (le volume change peu) et même que la surface totale de la cellule est réduite. Il n'est pas étonnant de voir aucun gonflement des cellules, car ces organismes présente une structure particulière monolipidique de leur membrane qui

pourrait empêcher la dilatation des membranes. Si la pression osmotique est trop importante les cellules ne gonflent pas et éclatent directement lorsque la force engendrée par la pression devient trop importante.

A la vue de ces observations, il est possible d'émettre deux hypothèses :

- Hypothèse 1 : les cellules essaient de maintenir leur concentration en sel intracellulaire en bloquant tous les échanges avec le milieu extracellulaire (et ainsi conserver le potassium intracellulaire), elles protègent ainsi leur protéome de la baisse de salinité. Dans cette hypothèse les cellules doivent subir une pression osmotique énorme. Pour pallier cette contrainte physique, les cellules changent de forme pour diminuer la surface d'échange et prendre une forme sphérique plus optimale. D'après les mesures de sel intracellulaire effectuées, cette hypothèse pourrait être valable pour une concentration en sel extracellulaire supérieure à 2,5M, en-dessous de cette concentration, nous observons une diminution drastique de la concentration en sel intracellulaire.
- Hypothèse 2 : les cellules expulsent ou laissent sortir le sel à l'extérieur de leur cytoplasme, ainsi la différence de pression osmotique ne fait pas rentrer de l'eau en masse. Par contre, dans ces conditions, les protéines halophiles vont probablement être dénaturées en masse du fait de leur repliement sel dépendant. Il faudrait donc une induction des systèmes de protection des protéines (soluté compatible, induction de chaperonne, ...) et de dégradation (protéases) pour récupérer ou éliminer toutes les protéines superflues et dénaturées. Le changement morphologique est dû à la dégradation de nombreux composants de la cellule et peut-être d'un cyto-squelette primitif ou de l'exo-squelette(S-layer).

Etude de la composition globale du protéome au cours du stress progressif.

Pour voir si ces changements morphologiques et la chute importante de la concentration saline intracellulaire s'accompagnent de changements dans la composition du protéome (dégradations, accumulation,..), nous avons amorcés des analyses sur la com-

position des extraits protéiques de nos cellules au cours du stress progressif. Pour cela nous avons déposé les extraits protéiques cytoplasmiques (S30) sur un gel de séparation des protéines (SDS/PAGE 12% voir chapitre 14.4.1 (résultats figure 9.11).

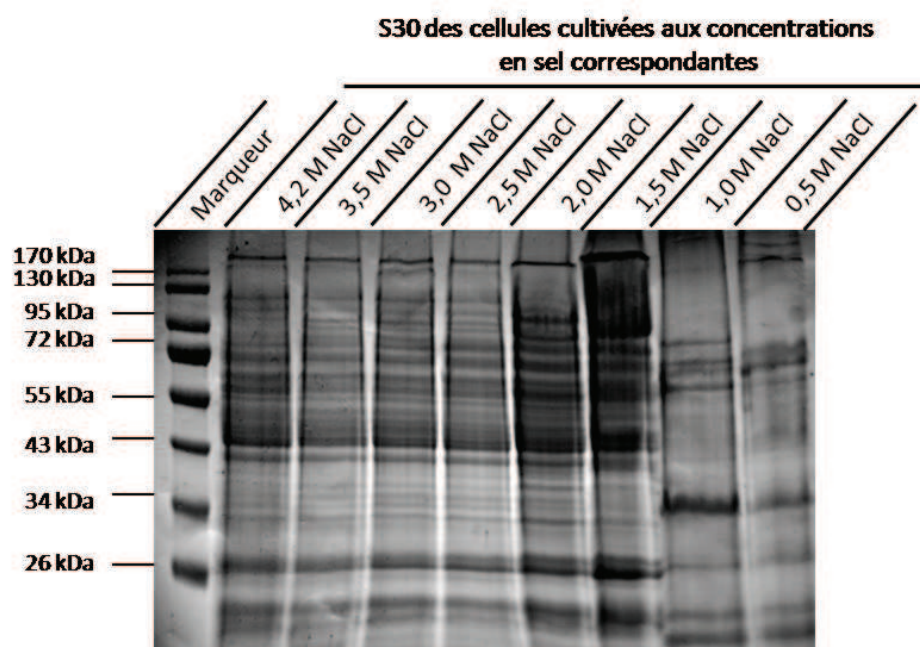


FIGURE 9.11 – **Etat du protéome lors d'un stress salin progressif** : analyse par gel SDS/PAGE 12% dénaturant coloré au bleu de Coomassie, des protéines des extraits cytoplasmiques d'*H.salinarum* soumis à un stress basse salinité progressive. La légende du haut correspond à la concentration extracellulaire en NaCl.

Nous pouvons voir que de 4,2M à 2,5M NaCl extracellulaire, aucune modification du protéome intracellulaire n'est détectable avec ce type d'analyse. À partir de 2,0M NaCl, on observe une épuration progressive du protéome.

Pour réaliser cette figure, une quantité similaire de protéines a été déposée dans chaque puits. L'augmentation de l'intensité des bandes (pour des concentrations en-dessous de 2M NaCl extracellulaire) pour une même protéine n'est donc pas directement assimilable à une induction ou à une accumulation, mais peut seulement refléter la conservation de cette protéine. Si nous sommes en présence du dernier cas ("conservation de cette protéine"), il est mis en évidence un effondrement de la diversité des protéines

sauf pour une dizaine d'entre elles.

Ce dernier travail a été réalisé par Camille Cibot au cours de son stage de Master 2 et doit être reproduit. De plus une analyse complète des différentes protéines conservées lors du stress devient une voie de recherche intéressante pour mieux comprendre l'adaptation au stress et les processus mis en jeu pour permettre non seulement la survie mais aussi le re-démarrage de la croissance lorsque ces cellules sont remises dans des conditions favorables. Une étude réalisé en 2008 fait état d'une "up-régulation" d'une poignée de protéines (dont les fonctions sont inconnues) au cours d'un choc bas sel à 2,6M et d'une "down-régulation" du reste du protéome [110].

9.2 Discussion

Il est admis par la communauté scientifique s'intéressant aux microorganismes halophiles extrêmes, que les faibles conditions de salinité de leur environnement constituent des conditions ioniques inappropriées pour ces organismes [108] [37]. La plupart des protéines de ces organismes ne sont solubles et fonctionnelles que dans des concentrations de K^+ multimolaires dues à une association forte du sel avec la structure des protéines halophiles [29]. Cette association permet une solubilité et une stabilité optimale dans des cytoplasmes saturés en sel. De plus, l'intégrité de la membrane cellulaire dépend de la forte concentration en cations intracellulaires, permettant de contrebalancer la pression osmotique [37] [103].

La lyse survient donc à des concentrations en NaCl inférieures ou égale à 1.5M [24]. Cependant, le travail effectué au cours de ma thèse a permis de montrer que cette lyse n'a lieu que lors d'une baisse brutale de la salinité extracellulaire. Un stress appliqué de manière très progressive, par dilution du milieu extracellulaire (par exemple avec une pompe péristaltique) permet aux cellules de survivre à de faibles concentrations salines extracellulaires. Cette technique permet de mimer ce que ces organismes pourraient subir dans leur environnement naturel lors de pluies ou inondations. Bien qu'elles ne soient plus capables de se diviser (forme de latence ou *turn over* proche de 1), ces cellules se maintiennent pendant plusieurs semaines, à une concentration saline équivalente à celle de l'eau de mer (0.5M NaCl).

La caractérisation par microscopie photonique et électronique du mécanisme de transformation morphologique associé à ce type de stress a permis de décrire le processus de rétraction de la forme de bâtonnet d'*H. salinarum* menant vers une forme ovoïdale. Ce mécanisme qui n'est pas une sporulation, est dynamique et dépendant de la concentration en sel extracellulaire.

L'observation de la diminution de la surface des cellules sans changement drastique du volume limiterait les interactions de *H. salinarum* avec l'extérieur et les risques de chocs osmotiques. Aucun épaissement de la paroi n'est observé. Ceci suggère qu'une

réduction ou un réarrangement de la membrane a eu lieu.

Ces données soutiennent l'hypothèse de la protection des cellules par le changement de forme et par la rétention du sel à l'intérieur du cytoplasme, dans le sens où dans une première étape (jusqu'à une concentration extracellulaire en NaCl supérieure à 2,0M), cette réponse va permettre de gagner du temps pour la cellule, afin que celle-ci puisse créer suffisamment de protéines ou de composés "protecteurs" (protéines chaperonnes ou solutés compatibles) dans des conditions favorables à leur repliement (maintien d'une concentration en K^+ intracellulaire supérieur à 2M) ou bien que la machinerie cellulaire soit encore capable de produire certaines protéines peu halophile composant une sorte de kit de survie à la basse salinité et pouvant permettre le redémarrage des cellules lorsque les conditions saline extracellulaire redeviennent favorables.

Mais cette réponse n'est que transitoire et non suffisante en cas de stress de forte intensité où le système de rétention en sel (pompes sodium potassium) n'est plus capable de maintenir le gradient de cation. En dessous de la concentration critique de 2M d'NaCl extracellulaire et si le stress est très progressif, laissant ainsi le temps à la cellule de protéger certains de ses composants (dont une dizaine de protéines), les résultats soutiennent plutôt une deuxième hypothèse qui est que les cellules ne retiennent plus le sel en leur cytoplasme et utilisent d'autres systèmes de protection comme les protéines chaperonnes, des osmoportectants,...

En effet, lors de cette adaptation progressive à la basse salinité, nous pouvons observer une clarification massive du protéome ou une "super" induction de quelques protéines. Cette modification du protéome des cellules en-dessous de 2,5M NaCl peut être mis en relation avec l'incapacité des cellules à se diviser en-dessous de cette concentration, gardant ainsi le maximum d'énergie pour activer les systèmes de protections. Les mécanismes cellulaires responsables, à savoir la modification du transcriptome, la destruction et/ou la stabilisation de protéines sont encore à identifier [110]. La clarification du protéome serait une stratégie indispensable pour limiter la production de protéines et ainsi éviter la forte toxicité d'une agrégation massive des protéines dans

le cytoplasme. Il serait également intéressant de savoir si les protéines conservées dans ces conditions sont celles qui ont des propriétés non halophiles leur permettant de rester fonctionnelles dans de telles conditions. On peut aussi penser que les protéines maintenues ont une fonction indispensable pour le maintien de l'intégrité cellulaire (synthèse d'osmoprotectants [111]) ou qu'elles représentent le kit minimum de survie indispensable pour maintenir une activité métabolique basale. Il est aussi possible que cet organisme ne conserve que des protéines destinées à assurer le redémarrage du métabolisme après la phase de latence.

Ce mécanisme de latence permettrait d'expliquer la colonisation d'espaces hyper-salins favorables à ces organismes, par le passage dans des zones hypo-salines telles que la mer et la présence de nombreux halophiles dans les sols et d'autres environnements hypo-salins [104].

Dans cette perspective, il faudrait explorer l'induction des protéines chaperonnes, des protéases et des solutés compatibles au cours du stress hypo-salin. Une étude a été amorcée, où il est question du rôle du complexe protéasome et d'une protéine chaperonne, dans des conditions de stress (hypo-salin et thermique), les résultats sont traités dans le chapitre suivant (voir chapitre III).

Le dosage des solutés compatibles sera réalisé dans un futur proche par RMN. De plus, une mesure de l'ADN 16s par marquage (technique Fish) pourrait être nécessaire pour "prouver" que toutes nos cellules adaptées sont bien en réalité des *Halobacterium salinarum* et non un contaminant extérieur viable à 0.5M. Cette hypothèse semble peu probable car nous avons bien identifié le changement morphologique des cellules et nous ne voyons pas de croissance à 0.5M (car si nous avons un contaminant, cela voudrait dire qu'il possède un *turn-over* (division/mort cellulaire) égal à 1). De plus, même si le redémarrage après un stress intense est long (autour de 3 semaines), nous l'avons confirmé en milieu liquide et en milieu solide.

Troisième partie

Contribution à la compréhension
du rôle du système protéolytique
PAN-protéasome chez l'Archaea
halophile extrême *Halobacterium*
salinarum

Chapitre 10

Résumé de l'article 1 voir annexe 16 : Régulation du système protéolytique PAN-protéasome au cours de stress thermiques et hypo-salin chez *Halobacterium salinarum*.

Ce travail a été publié dans le journal Extremophiles en Janvier 2012 ??, il sera présenté sous forme de résumé d'article. L'article est joint en annexe 16. Ma contribution à cet article se trouve dans l'identification et le choix des conditions de stress, ainsi que dans la répétition des expériences de croissance et des tests d'activités en présence de drogues qui inhibent l'activité du protéasome.

10.1 Introduction

L'activité du protéasome régule différents processus cellulaires requérant la destruction de protéine. La régulation du protéasome pour le contrôle des processus physiologiques cellulaires reste encore mal défini. Chez les Eucaryotes, la difficulté pour comprendre les processus de régulation est dû au nombre élevé de sous-unités différentes du complexe protéasome, ainsi qu'à la distinction de l'activité du protéasome par rapport aux autres activités cellulaires endopeptidasiques et enfin au cloisonnement des différentes activités protéolytiques dans des organites et des vésicules. Ce travail vise à fournir des informations sur le rôle du système protéasome dans la physiologie des cellules procaryotes, avec un accent sur la croissance, la réponse au stress et l'adaptation halophile. Nous avons étudié la régulation du système PAN-protéasome de l'archée halophile *Halobacterium salinarum* au cours de stress thermiques et hypo-salins. Comme vu dans les chapitre précédents, les condition hypo-saline représentent pour ce type d'organisme un stress naturel d'un genre unique, qui se traduit par la synthèse de nombreuses protéines de réponse au stress [112] [101] [113]. De plus cet organisme possède un système protéolytique plus simple que celui des Eucaryotes, ce système ne comprend que deux types de sous-unités formant le noyau peptidase 20S et deux ATPases, PANA et PANB, formant la particule activatrice du protéasome [114].

10.2 Résultats

10.2.1 Régulation de l'activité endopeptidasique et de la transcription du système PAN-protéasome pendant la croissance cellulaire.

Pour montrer l'importance de la régulation du protéasome pendant la croissance des archées, l'activité peptidase du complexe 20S a été mesurée, ainsi que l'expression

des gènes codants pour des sous-unités du système PAN-protéasome.

Pour cela les protéasomes natifs ont été partiellement purifiés au cours de la croissance cellulaire de culture d'*Halobacterium salinarum* par ultracentrifugation en gradient de densité. Pour la visualisation de la régulation de l'activité transcriptionnelle, des expériences de Northern-Blot sur les deux sous-unités du protéasome ainsi que sur les deux PAN ont été réalisées (pour plus de précision sur les techniques et la méthode utilisées, se référer à l'article 16).

Les profils cinétiques de l'activité endopeptidasique ont montré que l'accumulation du protéasome 20S est modifiée en fonction de l'état physiologique des cellules (voir résultats figure 10.1 et figure 10.8 du chapitre 10.3.1).

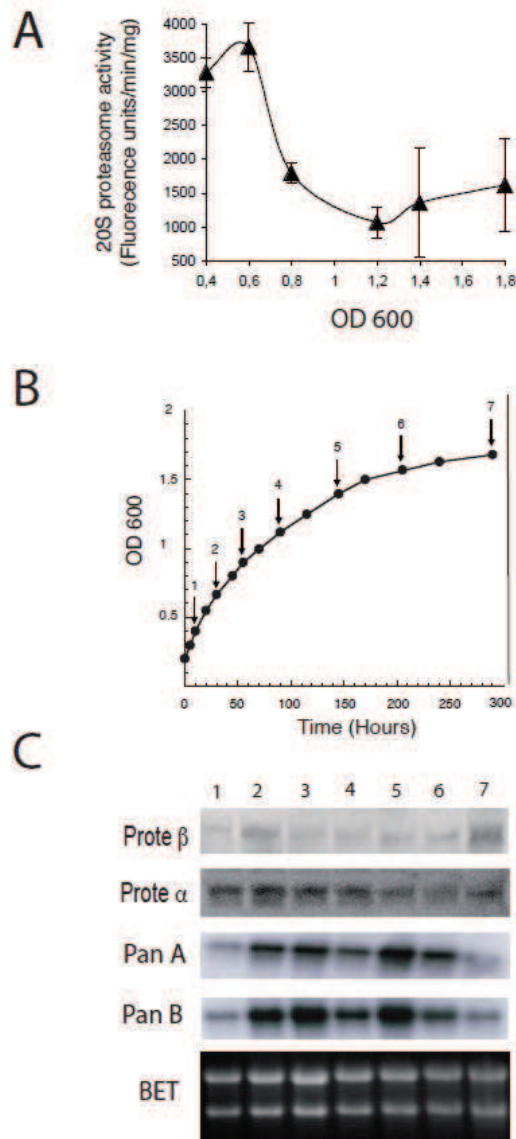


FIGURE 10.1 – Modifications de l'activité du protéasome 20S et de l'expression des sous-unités du complexe PAN-protéasome lors de la croissance cellulaire chez *Halobacterium*. **A.** Mesure de l'activités endopeptidasique du protéasome 20S en utilisant le substrat peptidique fluorogénique Suc-LLVY-AMC. L'activité peptidasique est tracée en fonction de la densité cellulaire (DO 600nm). **B.** Courbe de croissance d'*Halobacterium* : les chiffres en dessus des flèches correspondent aux différents temps d'échantillonnage utilisés pour l'extraction des ARNs totaux. **C.** Analyse de l'expression des sous-unités du complexe PAN-protéasome par Northern-Blot. Pour plus d'information sur les techniques expérimentales voir l'article en annexe

Un maximum d'activités endopeptidasiques ainsi qu'un maximum d'accumulation de transcrits des sous-unités du protéasome ont été mesurés dans les extraits cellulaires en début de phase exponentielle (autour d'une DO de 0,6). Puis, pendant la phase de croissance exponentielle, une réduction drastique est observable pour à la fois l'activité endopeptidasique (divisée par 3 par rapport à l'activité maximum mesurée à la DO 0,6) et l'accumulation des ARNm. Un léger regain arrive en phase stationnaire (après la DO 1,2). Une régulation transcriptionnelle semblable a également été observée pour les deux sous-unités activatrices PAN.

Un changement de l'activité du protéasome avait déjà été observée au cours de la croissance chez la levure où l'assemblage du protéasome 20S est nécessaire pour la survie durant la phase stationnaire [115]. Chez les archées, une accumulation du niveau des transcrits du protéasome avait aussi été détectée chez *Haloferax volcanii* au cours de la phase stationnaire [116]. Prises ensembles, ces observations suggèrent que la régulation transcriptionnelle intervient sur tous les composants du système Pan-protéasome et que cette régulation est importante pour le contrôle de l'activité protéolytique intracellulaire en fonction de la phase de croissance. L'augmentation observée dans l'activité protéolytiques combinée avec l'accumulation cellulaire du complexe protéolytique PAN-protéasome pourrait être nécessaire pour éliminer les produits défectueux résultants de la traduction ribosomale en début de croissance c'est-à-dire lorsque les cellules sont en train de traduire activement de nouvelles protéines, mais aussi pour l'élimination de protéines indésirables à des fins métaboliques ou de régulations au cours de la phase stationnaire.

10.2.2 Régulation de l'activité endopeptidasique et de la transcription du système PAN-protéasome au cours de la réponse aux stress.

Chez les micro-organismes, les stress de nature physique provoquent des changements de conformation des protéines intracellulaires. S'il est bien connu que les protéines chaperonnes sont induites dans ces conditions chez les archées, la régulation du système protéasome n'est pas encore totalement défini.

De précédentes études de transcriptomique ont montré, chez les archées hyperthermophiles, que la quantité d'ARNm d'une des deux sous-unités bêta du protéasome était augmentée lors de stress thermiques, tandis que la quantité d'ARNm de la sous-unité alpha est en baisse [117].

Pour étudier la réponse aux stress, nous avons choisi dans ce travail, le stress thermique, mais aussi des conditions de stress hypo-salin pour lesquelles les protéines mal-repliées s'accumulent (voir résultats figures 10.2 pour le stress thermique et 10.3 pour le stress hypo-salin).

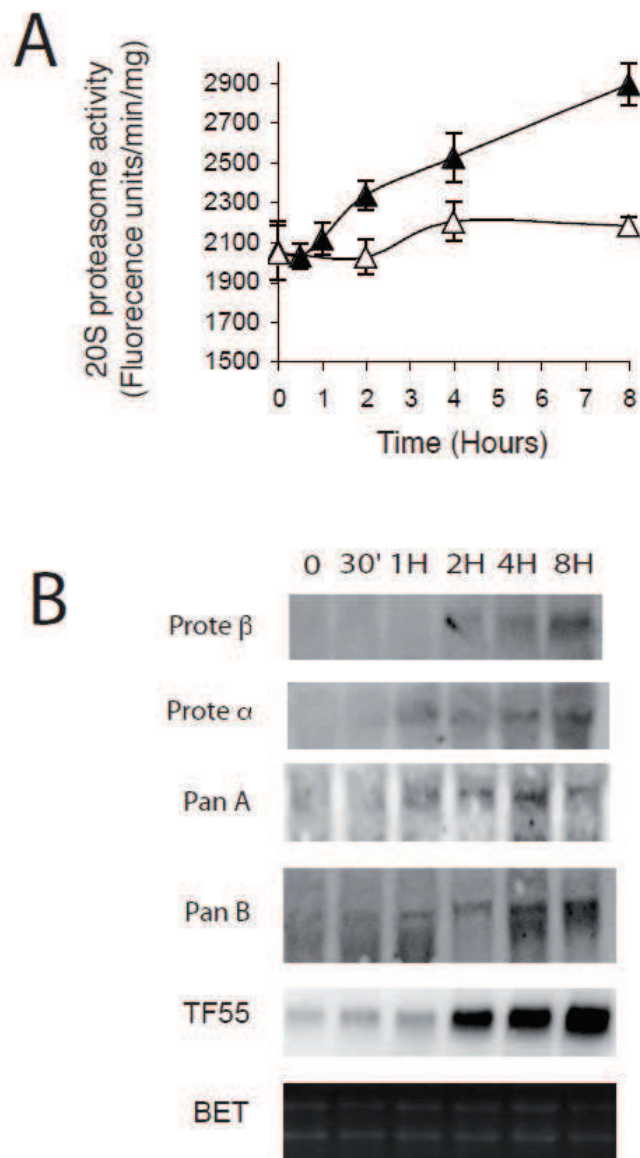


FIGURE 10.2 – Mesure de l'activité du protéasome 20S et quantification de l'accumulation de transcript des quatre gènes codant pour les sous-unités du système PAN-protéasome lors d'une réponse à un *stress thermique* chez *Halobacterium*. **A.** Activités endo-peptidases intracellulaires du complexe 20S. Une culture est divisée en deux, une partie est mise à 37°C (triangles blancs) l'autre à 55°C (triangles noirs). **B.** Analyse du nombre d'ARNm par Northern-blot des différentes sous-unités du complexe PAN-protéasome lors de l'application sur les cultures d'un stress thermique à 55°C, mesures effectuées dans les premiers temps de la réponse au stress.

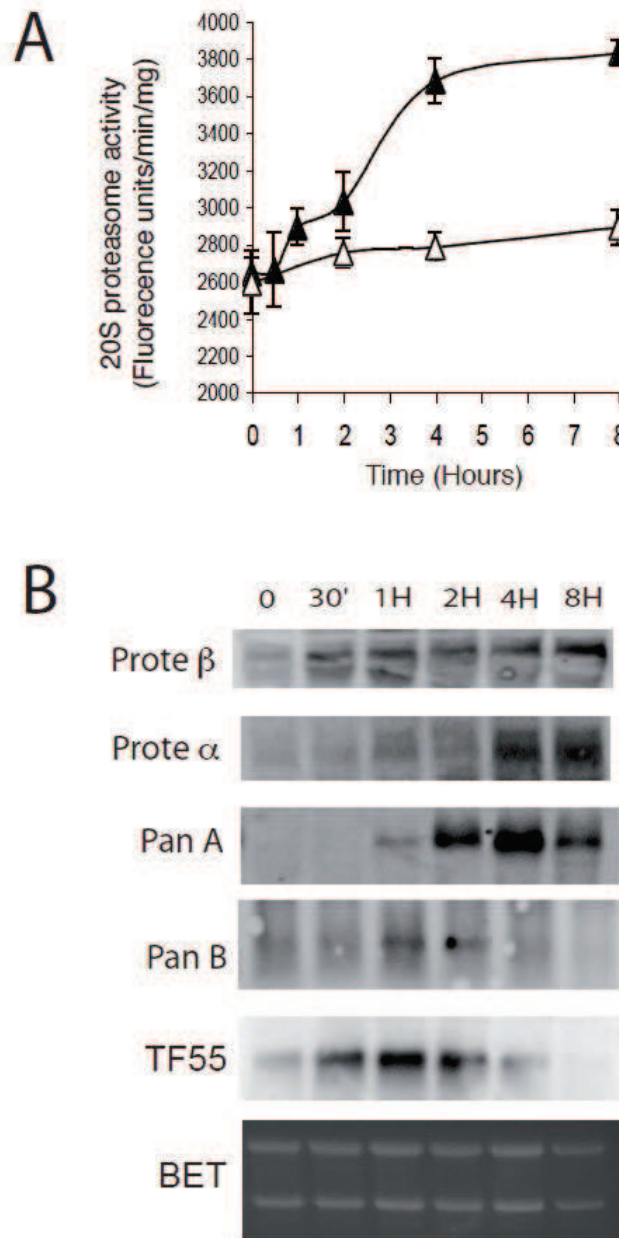


FIGURE 10.3 – Induction de l'activité du protéasome 20S et quantification de l'accumulation de transcript des quatre gènes codant pour les sous-unités du système PAN-protéasome lors d'une réponse à un *stress hypo-salin* chez *Halobacterium*. **A.** Activités endo-peptidases intracellulaires du complexe 20S. Une culture est divisée en deux, une partie est diluée avec du milieu normal (triangles blancs) l'autre avec un milieu sans sel (triangles noirs) les volumes à ajouter sont ajusté afin d'avoir une concentration extracellulaire en NaCl de 4,2M et 2,5M respectivement. **B.** Analyse du nombre d'ARNm par Northern-blot des différentes sous-unité du complexe PAN-protéasome lors de l'application sur les cultures d'un stress hypo-salin à 2,5M NaCl extracellulaire, mesures effectuées dans les premiers temps de la réponse au stress.

Après l'exposition au stress, que se soit pour le stress thermique ou hypo-salin, nous avons mesuré une augmentation significative de l'activité du protéasome ainsi qu'une forte accumulation de transcripts des sous-unités alpha et bêta du protéasome, ainsi que des deux sous-unités du complexe PAN.

Chez *T.acidophilum*, il a été montré qu'une inhibition chimique partielle de l'activité peptidasique 20S réduit considérablement la capacité des cellules à surmonter le choc thermique [118]. En outre, les complexes du protéasome 20S de **T.acidophilum** et de *H.marismortui* restent stables, in vitro, dans des conditions de stress thermique et de stress hypo-salin et conservent dans ces conditions une activité endo-peptidasique permettant la destruction des protéines mal repliées [119] [120].

Nos observations suggèrent que, chez les archées halophiles, la régulation transcriptionnelle coordonnée de toutes les sous-unités du complexe PAN-protéasome joue un rôle important dans la réponse cellulaire aux stress environnementaux et donc dans l'adaptation extrêmophile pour compenser l'effet délétère des variations de température et de sel sur la stabilité des protéines.

10.2.3 Etat d'oligomérisation et interactions physiques des protéines PANA et PANB chez *Halobacterium*.

Les sous-unités activatrice AAA ATPase (donc dépendante d'énergie) du protéasome stimulent la dégradation des protéines. Chez la levure, des études de mutagenèse ont révélé que les 6 différentes Rpt ATPases du protéasome avait une grande diversité non-redondance de fonction [121]. Dans tous les AAA ATPases, le domaine N-terminal est indispensable pour la reconnaissance du substrat. Il a été proposé que les motifs *coiled coil* (faisceau d'hélices) présents dans les régions N-terminales des AAA ATPases sont impliqués dans l'interaction des substrats protéiques avec le complexe, leurs interactions générant le processus d'oligomérisation [122]. Chez *Halobacterium*, la présence

de deux protéines PAN avec différentes régions N-terminale pourrait être le signe qu'il existe, dans la physiologie cellulaire, des rôles et des spécificités de substrats différents pour ces deux protéines.

Nos études par *Northern-blot* ont montré que, chez *Halobacterium*, que les deux sous-unités de PAN n'affichent pas des profils d'expression différents au cours de la croissance cellulaire et lors de la réponse au stress. Ces données sont en faveur d'un rôle similaire des protéines PANA et PANB dans la physiologie cellulaire (voir figure 10.1, 10.2 et 10.3).

Les expériences de co-immunoprécipitations (voir résultats figure 10.4) indiquent que les deux protéines PAN interagissent l'une avec l'autre au sein d'extraits cellulaires d'*Halobacterium*.



FIGURE 10.4 – Détection par co-immunoprécipitation des interactions physiques entre les sous-unités ATPasiques régulatrices du protéasome PANA et PANB . Des extraits protéiques *Halobacterium* ont été incubées avec des anticorps anti-PANA ou anti-PANB. Les complexes immuns ont été précipités en utilisant des billes de protéine A sépharose et analysés par *Western-Blot* avec les anticorps anti-PANA ou anti-APNB.

Cette constatation suggère que les deux sous-unités PAN forme des complexes hétéro-oligomériques sous forme d'anneaux au sein des cellules. Ces données s'accordent avec l'hypothèse que les protéines PANA et PANB ne sont pas spécialisées dans des fonctions de dégradations cellulaires différentes. Cette conclusion est compatible avec un rapport sur les composants du protéasome chez *Haloferax volcanii* qui montrait qu'il fallait déléter les deux protéines PAN pour donner un phénotype létal, ce qui implique que ces deux protéines sont impliquées dans des fonctions similaires [123]. Toutefois, il reste possible que la composition en sous-unités du complexe oligomérique PAN per-

mette de modifier l'affinité du complexe pour des substrats de natures différentes, ce qui pourrait ainsi permettre des réglages plus précis dans les profils de dégradation des protéines.

10.2.4 Les cellules *Halobacterium* peuvent maintenir leur croissance cellulaire dans des conditions normales et de stress malgré une déficience du protéasome.

Des études génétiques sur la fonction du protéasome chez *Haloferax volcanii* ont montré qu'une délétion des sous-unités bêta du protéasome est létale [123]. Par conséquence, l'inhibition partielle du protéasome par des inhibiteurs chimiques spécifiques comme le NLVS (NIP-Leu3-vinylsulfone ou 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone) représente un outil pour étudier la contribution du protéasome in vivo chez *Halobacterium* pendant différentes fonctions cellulaires comme la croissance et la réponse au stress. Dans cette étude, nous avons utilisé le NLVS, qui est un inhibiteur spécifique du protéasome, son action a été démontré chez les eucaryotes et les archées, il génère des modifications irréversibles sur les sous-unités β du protéasome [124]. Chez les eucaryotes, l'utilisation de cet inhibiteur affecte généralement la prolifération cellulaire. Dans nos expériences, le taux de croissance des cellules *Halobacterium* n'a pas été significativement affecté malgré une perte spectaculaire de l'activité endo-peptidasique du protéasome 20S (voir résultats figures 10.5).

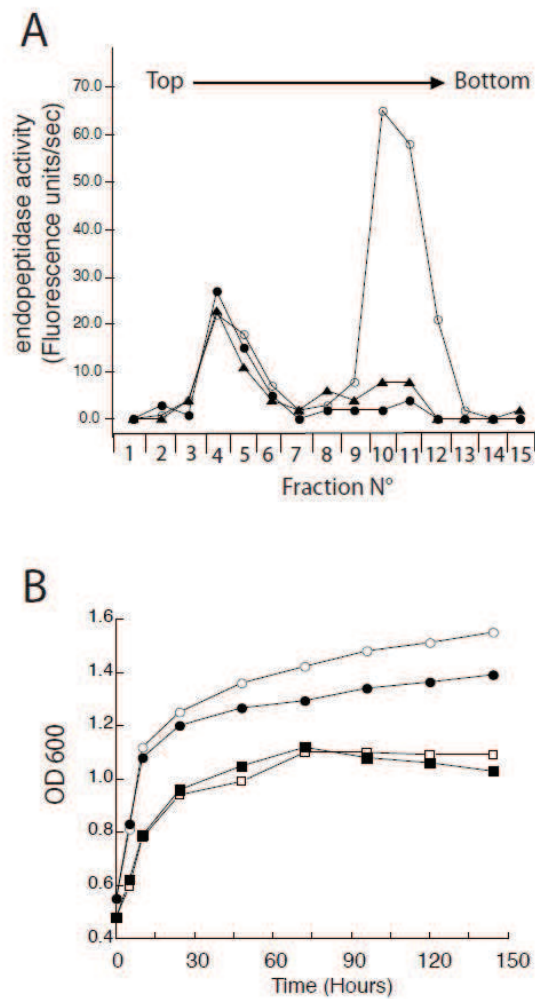


FIGURE 10.5 – Effets de l’inhibition du protéasome dans des conditions normales de croissance ainsi que dans des conditions de choc thermique. **A.** Évaluation de l’inhibition de l’activité du protéasome 20S chez *Halobacterium* par l’inhibiteur spécifique du protéasome NLVS. Après 8 heures de traitement des cultures cellulaires avec 30 μ M de NLVS, les protéines ont été extraites et des quantités égales de celle-ci ont été séparées sur gradient de sucrose 5-25%. L’activité peptidase 20S a été mesurée dans les différentes fractions (voir article pour plus de détail). Les échantillons de cultures cellulaires non traités sont représentés en cercles blancs ; les échantillons de cultures cellulaires traités avec le NLVS sont représentés en triangles noirs ; les cercles noirs correspondent à un contrôle négatif, c’est à dire un échantillon de culture cellulaire non traité auquel on ajoute avant le fractionnement sur gradient de sucrose 5 μ M de NLVS. **B.** Les courbes de croissance des cultures d’*Halobacterium* en présence d’inhibiteur du protéasome (30 μ M de NLVS). Les cercles blancs et carrés blancs correspondent aux cultures cellulaires non traitées cultivées respectivement à 37°C et 55°C. Les cercles noirs et les carrés noirs correspondent aux cultures cellulaires traitées et cultivées respectivement à 37°C et 55°C.

Ces résultats impliquent qu'un niveau élevé de particules 20S actives n'est pas nécessaire pour la croissance. Ces résultats sont surprenants, en effet les études enzymatiques et d'expression génique rapportées dans ce document indiquent que l'activité endopeptidasique et l'expression des gènes codants pour les sous-unités du complexe protéasome sont modifiées lors de la croissance. Cette théorie peut s'expliquer par le fait qu'il est possible que d'autres protéases cytosoliques ou membranaires telles que Lon prennent le relais et assurent des fonctions de protéolyse en fonctionnant sur les mêmes substrats que le protéasome 20S et permettant de compenser l'activité "manquante" du protéasome dans ces conditions de croissance. Chez les eucaryotes, il a été mesuré une augmentation des activités peptidasiques dans le cytosol des cellules déficientes en protéasome [124]. Ce résultat est également compatible avec l'observation que, chez *Haloferax volcanii*, le taux de dégradation du substrat GFP spécifique du protéasome n'a été que légèrement réduit en présence de l'inhibiteur du protéasome clastro lactacystine [125].

L'absence de modifications significatives dans le taux de croissance et de viabilité des cellules d'*Halobacterium*, traitées avec le NLVS, lors d'un choc thermique est plus surprenante. Comme indiqué par la forte induction de la sous-unité du thermosome TF55, les conditions que nous avons utilisées devraient provoquer une accumulation délétère de protéines mal-repliées dans le cytosol. Avec une détérioration importante de l'activité enzymatique du protéasome, on devrait s'attendre à un effet drastique sur la capacité des cellules à surmonter les conditions de stress environnementaux. Comme mentionné plus haut, le fait de ne pas avoir de profil différent lors de la croissance des cultures soumises ou non à la drogue, pourrait être dû à l'activation ou la sur-expression d'autres systèmes protéolytiques compensatoires. Mais chez *Thermoplasma acidophilum*, des expériences similaires de stress utilisant aussi l'inhibiteur NLVS, ont montré des effets graves sur la croissance cellulaire [118]. Les halophiles ont évolué pour résister aux multiples stress extrêmes de leur environnement hyper-salin comme la température, le sel, le rayonnement, les métaux lourds ; il est possible que ces orga-

nismes aient développé une limite de tolérance supérieure envers le stress par rapport à d'autres archées, par le biais de systèmes de protection comme les chaperonnes, mais aussi par le biais de systèmes protéolytique compensatoire ou plus efficaces.

10.3 Données supplémentaires à l'article 16 : Etude de l'effet de différentes drogues sur l'activité du protéasome de *Halobacterium salinarum* in vitro et in vivo

Dans le cadre de l'article 16, la drogue inhibitrice du protéasome NLVS a été utilisée. Au cours de cette précédente étude, une activité endopeptidasique fut observée dans les fractions de bas poids moléculaire. En réponse au blocage du protéasome par le NLVS, l'activité dans ces fractions de bas poids moléculaire augmentait de façon significative et pouvait donc venir compenser la perte d'activité lié au protéasome bloqué (tous ces résultats ne sont pas montrés dans l'article 16).

Nous avons entamé cette étude sur d'autres drogues inhibitrices du protéasome car la drogue NLVS n'est plus commercialisée à ce jour.

Les résultats de cette nouvelle étude ont été obtenus lors du stage de Master 2 de Camille Cibot que j'ai encadré. Nous souhaitons donc trouver une drogue ayant la même spécificité, une action similaire sur l'activité du protéasome et sur les cellules d'*Halobacterium* que le NLVS, ainsi qu'une induction similaire de l'activité "compensatoire" observée dans les fractions de bas poids moléculaire. L'étude s'est portée sur quatre drogues notées comme inhibitrice du protéasome : le bêta-lactone (noté cL β L), Epoxomycine, MG132 et Protease 1 Inhibitor (noté PI1)).

10.3.1 Effet des drogues sur la croissance

Pour tester les différentes drogues sur l'organisme *H.salinarum*, les différents inhibiteurs du protéasome 20S sont ajoutés à des cultures en début de phase exponentielle de croissance (DO 0,2-0,4) (voir résultats figure 10.6). Il a été décidé pour démarrer cette étude d'utiliser la même concentration d'inhibiteur que le NLVS, soit 5 μ M. Pour deux de ces drogues (MG132 et Protéase I inhibitor), aucun effet n'a été visible que ce soit sur la croissance et sur l'activité du protéasome 20S, il a donc été décidé d'augmenter leur concentration à 15 μ M lors de l'ajout aux cultures.

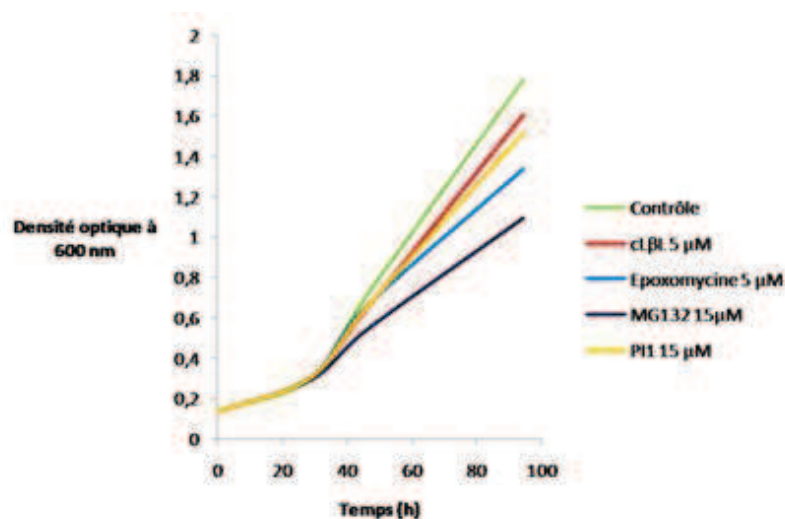


FIGURE 10.6 – **Suivi de la croissance cellulaire d'*Halobacterium* traité avec les différentes drogues** la quantité de drogue ajoutée aux cultures est notée à droite du nom des drogues

Contrairement à l'action du NLVS sur la croissance cellulaire d'*H.salinarum* (voir résultats figure 10.5) il est possible d'observer que l'impact de ces différentes drogues inhibitrices sur la croissance cellulaire n'est pas nul (voir résultats figure 10.6). Ces drogues ne sont pas létales à ces concentration mais elles ont toutes un impact sur la vitesse de croissance cellulaire. Ces résultats laissent penser que la spécificité de ces drogues n'est pas la même que celle du NLVS. Ces quatre inhibiteurs sont de courts peptides qui interagissent avec un ou plusieurs sites catalytiques du protéasome.

Le MG132 est un peptides aldéhyde synthétique. Il inhibe réversiblement l'activité chymotrypsin-like au sein du protéasome. Dans la littérature le MG132 est le plus utilisé pour inhiber le protéasome car il est censé être le plus actif, le plus spécifique et qu'il est perméable aux membranes. Le béta-lactone est un dérivé de la lactacystine, il inhibe irréversiblement l'activité chymotrypsin-like du protéasome (mais plus faiblement que le MG132) et est perméable aux membranes des cellules de mammifère et de levure. Par contre ce composé est le moins stable parmi les inhibiteurs du protéasome : même s'il est considéré comme un inhibiteur irréversible, il peut être hydrolysé à pH neutre, même lors de son interaction avec le protéasome, cette réaction permet au protéasome d'être de nouveau actif. L'époxomycine est aussi un inhibiteur d'origine naturelle faisant partie de la famille des expoxykétones. Il est connu comme un inhibiteur irréversible et très spécifique du protéasome. Il inhibe l'activité chymotrypsin-like seule ou couplée à l'activité post-acide glutamyl. Le Proteasome Inhibitor 1 est noté comme un inhibiteur réversible de l'activité chymotrypsine-like du protéasome dans les cellules HT4. Peu de ces composé ont été testés sur des Archaea, ces premières données nous montre qu'ils sont stables dans le temps à haute concentration saline (4,2M NaCl extracellulaire) et qu'ils sont capables de traverser la membrane des Archaea.

10.3.2 Effet des drogues sur l'activité du protéasome

Les cultures traitées ou non avec les 4 drogues ont été culottées, lysées et le protéome a été fractionné sur gradient de sucrose 5-20%. Ensuite, tout comme dans l'étude sur le protéasome avec l'inhibiteur NLVS, des tests d'activité endopeptidasique utilisant le substrat Succ-L-L-V-Y-AMC (voir Matériels et Méthodes) on été réalisés sur chaque fraction (voir résultat figure 10.7).

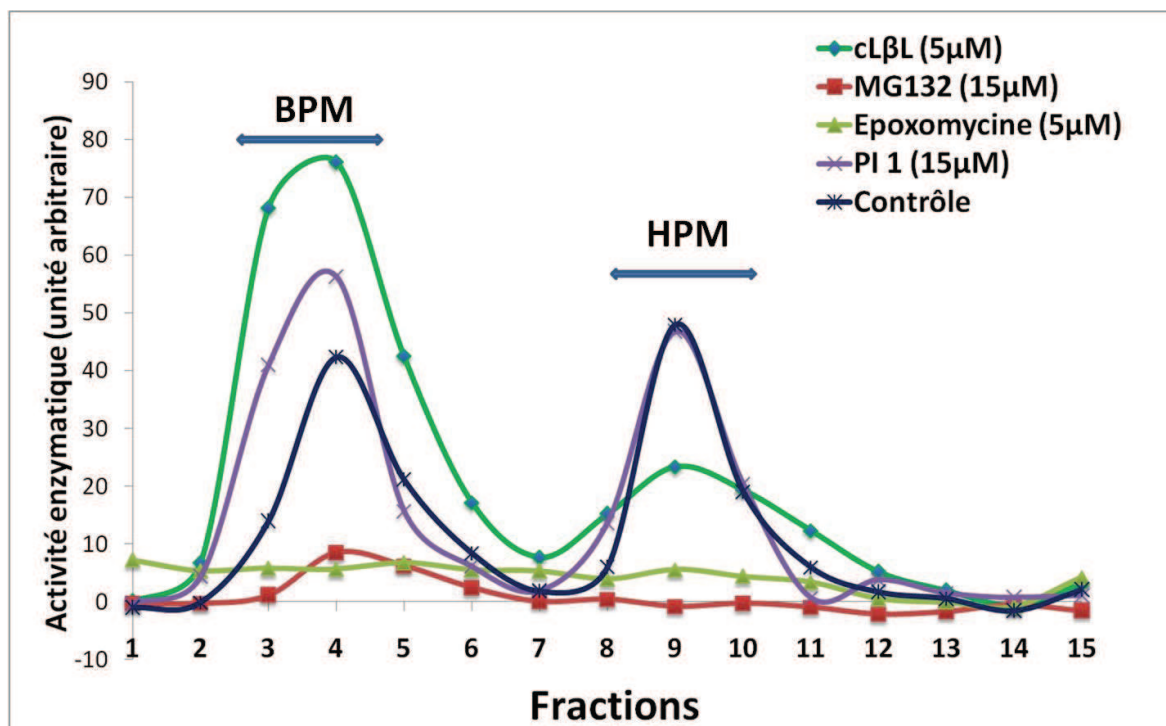


FIGURE 10.7 – Mesure de l’activité endo-peptidasique après inhibition ou non du protéasome *Halobacterium* in vivo par les différentes drogues. Mesure de l’activité endo-peptidase utilisant le substrat Succ-L-L-V-Y-AMC en fonction de chaque fraction obtenue à partir d’un gradient de sucrose réalisé sur le S30 de cellules *Halobacterium* traitées ou non (expérience contrôle) pendant 72h avec les quatre différents inhibiteurs du protéasome aux concentrations indiquées entre parenthèses.

L’expérience contrôle correspondant aux fractions cytosoliques de cellules n’ayant pas été cultivées en présence d’inhibiteur du protéasome, montre un profil caractéristique, constitué de deux pics d’activité endopeptidasique. L’un est situé dans les fractions 3-4-5 (appelées fractions de bas poids moléculaire BPM) et l’autre dans les fractions 8-9-10 (appelées fractions haut poids moléculaire HPM). L’activité sur les fractions de bas poids moléculaire correspond à l’activité de protéases intracellulaires inconnues, tandis que l’activité de fractions de haut poids moléculaire correspond à celle du protéasome 20S (voir la correspondance entre les fractions du gradient de sucrose et la position du protéasome dans le gradient dans l’article 16. Ces *pools* de fractions sont intéressants car les fractions HPM correspondent à un *pool* où l’on retrouve l’activité endopeptidasique du protéasome et les fractions BPM correspondent à un *pool* où l’on retrouve

des activité endo-peptidasiques pouvant compenser un blocage du protéasome et dont l'activité n'est pas sensible au NLVS.

Il est possible de remarquer que les profils observés sur la figure précédente ne correspondent pas exactement à celui de la figure 10.5, cela s'explique par le fait que les profils d'activités endopeptidasiques des fractions BPM et HPM dépendent de l'état de croissance des cellule(voir figure 10.8, à partir de ces résultats il est possible de voir que d'une part l'activité du protéasome fluctue au cours de la croissance (résultats similaires à la figure 10.1 A) et que d'autre part l'activité endopeptidasique des autres protéases cytosoliques fluctue presque de façon identique pendant la croissance. En effet une forte activité endo-peptidasique est détectée en début de croissance (donc après dilution d'une culture mère), puis l'activité chute à son minimum pour des cultures en début de phase exponentielle (activité divisé par 5), ensuite l'activité augmente progressivement pour atteindre son maximum en début de phase stationnaire.

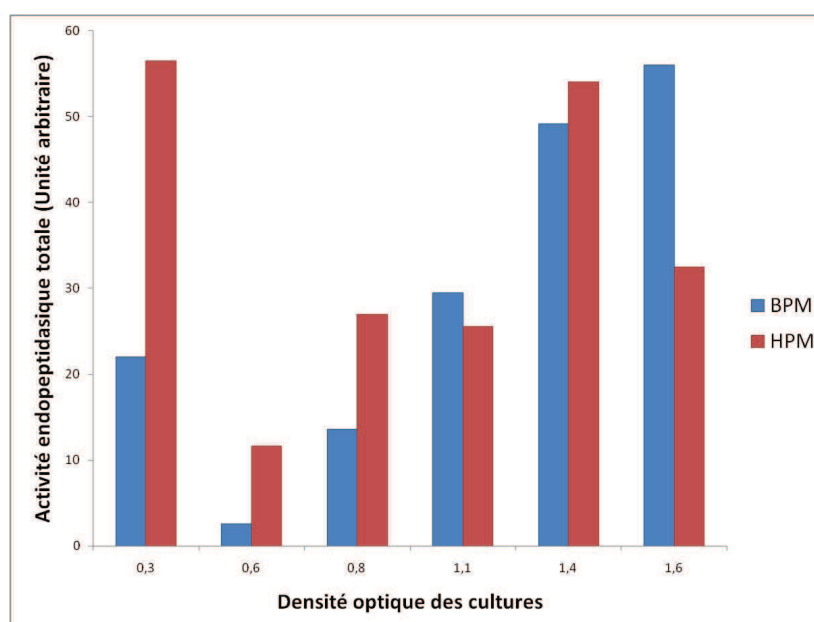


FIGURE 10.8 – Mesure de l'activité endopeptidasique sur les fractions de bas poids moléculaire et de haut poids moléculaire au cours de la croissance cellulaire. En rouge et en bleu, respectivement l'activité endopeptidasique des fractions de haut poids moléculaires (HPM) et de bas poids moléculaire (BPM) obtenues par fractionnement sur gradient de sucrose d'une culture au cours de la croissance.

Lors de la mesure de l'activité du protéasome dans les extraits de cellules traitées par les différents inhibiteurs (fractions HPM de la figure 10.7) , il a été possible de remarquer différents effets des drogues sur le profil d'activité endopeptidasique. Ainsi le traitement avec le PI1 semble inefficace, tandis que les autres inhibiteurs du protéasome provoquent une diminution de cette activité. Ainsi, le traitement avec la clasto-lactacystin β -lactone (cL β L) entraîne une chute d'environ 50% de l'activité du protéasome, tandis que celle provoquée par le MG-132 est presque totale. Enfin, l'inhibition complète du protéasome est observée lorsque les cellules sont traitées avec l'epoxomycine qui constitue donc l'inhibiteur le plus efficace. Nous pouvons donc conclure que, même avec un protéasome fortement inhibé par ces drogues, les Archaea restent vivantes et parviennent à se diviser. Par contre en regardant l'activité des fractions de BPM nous pouvons observer que la spécificité de ces drogues vis-à-vis du protéasome n'est pas optimal pour les drogues MG132 et Epoxomycine, car en effet ces drogues abaissent également l'activité détectée dans les fractions BPM. Par contre, le traitement des cellules par la cL β L provoque, parallèlement à la baisse d'activité du protéasome, une augmentation de l'activité endopeptidasique dans les fractions BPM, cette observation avait aussi été faite pour la drogue NLVS (données non montrée dans l'article).

Afin de vérifier l'action et la spécificité in vitro de ces inhibiteurs sur le protéasome 20S, les fractions d'intérêts (de BPM : fractions 3-4-5 et HPM : fractions 8-9-10) d'une culture en conditions normales ont été traitées pendant 1 heure avec les différentes drogues inhibitrices. Puis l'activité endopeptidasique a été mesurée (10.9A et B). Pour visualiser un effet optimal des inhibiteurs au bout d'une heure, nous avons choisi d'utiliser des concentrations supérieures à celle de l'expérience in vivo.

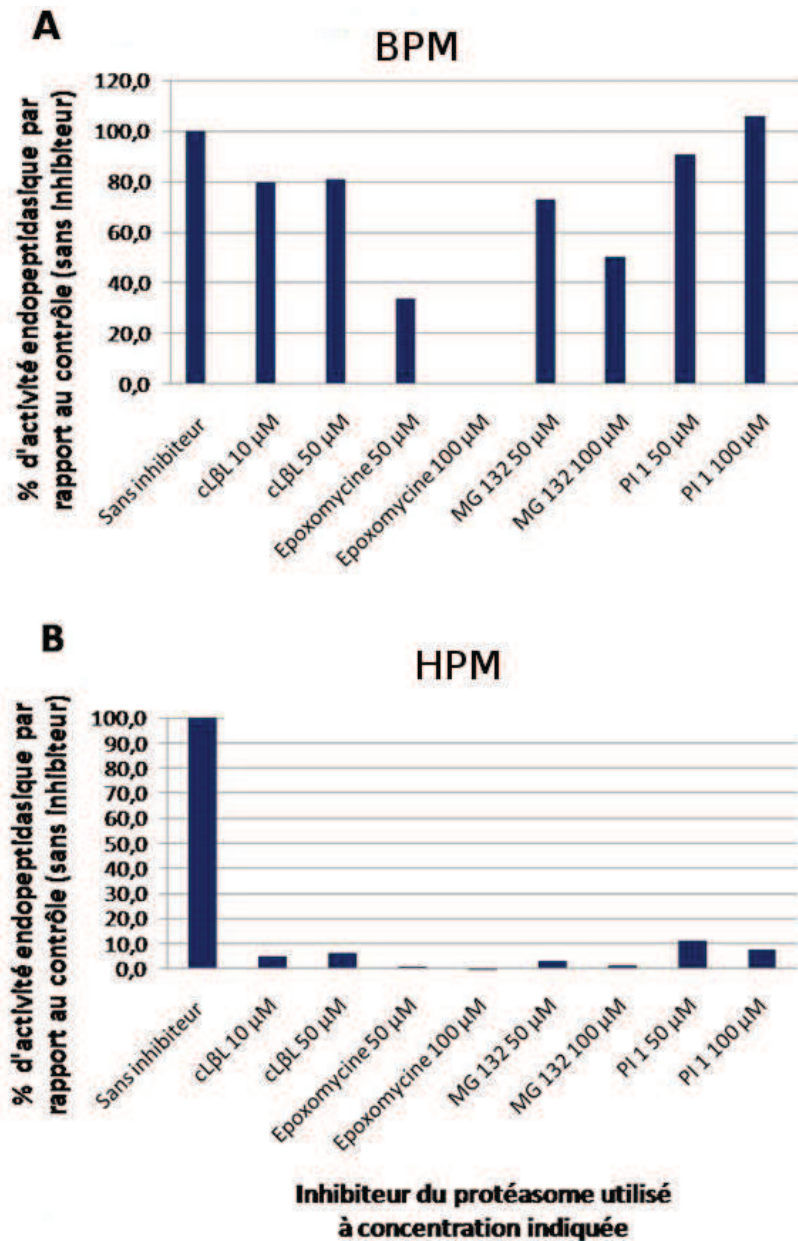


FIGURE 10.9 – Mesure de l'activité endo-peptidasique après inhibition ou non du protéasome in vitro par les différentes drogues. Mesure de l'action des drogues in vitro sur l'activité endopeptidasique en utilisant le substrat Succ-L-L-V-Y-AMC. Les protéines d'une culture en conditions normales ont été fractionnées sur un gradient de sucrose 5-20%, les fractions numéros 8-9-10 et 3-4-5 sont récupérées ensembles pour former un pool d'échantillon de haut poids moléculaire (HPM) et de bas poids moléculaire (BPM). On mesure sur chaque pool de fractions l'effet de l'ajout des drogues lors du test de l'activité endo-peptidasique (les échantillons sont incubés 1h avec les drogues). Les histogrammes correspondent aux pourcentages d'activité endopeptidasique par rapport à l'expérience sans inhibiteur (contrôle). **A.** correspond aux fractions BPM 3-4-5 et **B.** correspond aux fractions HPM 8-9-10.

Dans les fractions de HPM (résultats figure 10.9 B), nous pouvons voir une diminution de l'activité endopeptidasique du protéasome pour tous les inhibiteurs testés. Ces drogues affecte donc bien le protéasome in vitro d'une façon beaucoup plus importante que dans l'expérience in vivo : 90% de l'activité est inhibée au minimum. L'augmentation de l'inhibition du protéasome in vitro par rapport au in vivo peut s'expliquer par :

- Les concentrations des drogues inhibitrices utilisées.
- Le fait que les inhibiteurs peuvent agir directement sur le protéasome, sans devoir passer la membrane cellulaire.
- Un temps d'incubation "rapide", qui va limiter la dégradation des inhibiteurs.

On peut remarquer que l'époxomycine est l'inhibiteur le plus efficace à la concentration de 50 μ M.

Dans les fractions BPM (résultats figure 10.9) il est possible d'observer la spécificité de ces inhibiteurs. A l'exception de l'époxomycine qui inhibe très fortement l'activité endopeptidasique des fractions BPM, les inhibiteurs ne diminuent que légèrement (autour de 20%) l'activité endopeptidasique totale des autres protéases cytosoliques et cela même à forte concentration.

En conclusion, le meilleur candidat pour remplacer la drogue inhibitrice du protéasome NLVS semble être la CL β L : elle permet d'inhiber très fortement le protéasome in vitro, elle inhibe très légèrement l'activité endopeptidasique présente dans les fractions BPM, elle est capable de pénétrer les cellules d'archées et ainsi atteindre le protéasome in vivo, elle permet d'observer une activité compensatoire in vivo dans les fractions BPM. Il faut cependant optimiser sa concentration à utiliser in vivo pour avoir un effet d'inhibition du protéasome comparable à celui de la drogue inhibitrice NLVS.

10.4 Discussion

Chez les archées, l'importance du rôle du système protéasome dans les processus biologiques fondamentaux est encore mal défini. Des protéasomes natifs ont été partiellement purifiés à partir de *Halobacterium* par ultracentrifugation en gradient de densité. Les profils d'activité peptidasiques ont montré que l'accumulation de la particule 20S du système protéasome est modifiée en fonction de l'état physiologique des cellules. La quantité de particules 20S actifs dans des cellules augmente, chez *Halobacterium*, en réponse à des stress thermiques et de basse salinité. Dans les mêmes conditions expérimentales, des expériences de Northern-Blot ont montré une régulation positive de la transcription de la sous-unités alpha et bêta du protéasome, ainsi que des deux ATPases régulatrices du protéasome, PANA et PANB. De plus des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré l'existence d'une interaction physique entre les deux types de PAN dans des extraits cellulaires. Ainsi, une réglementation directe se produit sur les composants PAN-protéasome pour ajuster l'activité de dégradation de protéines lors de la croissance et en réponse à des stress environnementaux. Ces résultats indiquent également que, dans chez les halophiles extrêmes, la protéolyse effectuée par le système protéasome constitue une réponse importante de ces organisme face à un stress hypo-salin.

L'utilisation du NLVS (inhibiteurs du protéasome) ainsi que quatre autres drogues (marquées comme inhibitrices du protéasome) sur des cultures cellulaires a permis d'étudier la fonction cellulaire in vivo du protéasome chez *Halobacterium*. Ces drogues n'ont pas un effet important sur la croissance et sur la mortalité des cellules dans des conditions normales de croissance, mais aussi dans des conditions de choc thermique, bien que l'inhibition chimique de protéasomes est été mesurée dans les extraits cellulaires. Ces résultats suggèrent que les activateurs de PAN ou autres protéases compensent la perte de l'activité du protéasome dans des conditions de stress et lors de la croissance.

Quatrième partie

Etude du rôle de l'aminopeptidase TET dans la protéolyse intracellulaire chez les archées halophiles in vivo

L'étude du rôle de TET chez les halophile a été réalisé sur deux organismes halophiles *H.salinarum* et *H.volcanii*.

Nous avons choisit de travailler aussi sur l'organisme *H.volcanii*, car nous disposions pour cet organisme un mutant délété de la séquence d'une des deux TET. Ainsi, pour réaliser cette étude, nous avons utilisé la souche sauvage DS2 de *H.volcanii*, mais aussi un mutant délété d'une des deux protéases TET (souche CN5 de *H.volcanii*). La délétion du gène "tet" a été réalisée par Cédric Norais et est décrite dans son manuscrit de thèse. La technique pop-in/pop-out a été utilisée pour créer cette souche mutante. La technique pop-in/pop-out consiste à intégrer un plasmide non réplcatif au niveau du locus ciblé par recombinaison (pop-in) puis la suppression du gène d'intérêt s'effectue après une recombinaison homologue du plasmide au niveau de l'intégration (pop-out)[126].

Lorsque cette études a été initiées, le séquençage du génome d'*H.volcanii* n'était pas achevé, celui ci a été publié en 2010 [127]. Une analyse récente par "blastp" a été réalisé par Frédéric FROTTIN au cours de ça thèse et a permis de trouver un gène codant pour une séquence protéique ayant plus de 30% d'identité avec la séquence de la peptidase TET connue d'*H.volcanii*. Cette séquence est annotée sur le serveur UniProtKB comme étant homologue à la séquence de la peptidase TET. Deplus il a réalisé un alignement de cette "nouvelle" séquence avec les peptidases TET déjà caractérisées et il montre clairement l'origine commune de toutes ces protéases. Pour différencier ces deux TET présente chez *H.volcanii*, nous nommerons la peptidase TET venant d'être découverte TET2 et "l'ancienne" TET (déjà connu et donc celle dont nous disposons un mutant) nous la nommerons par la suite seulement TET.

Enfin, il est a noté que des test on été réalisé au laboratoire pour délété ou cloner la séquence de TET de l'organisme *H.salinarum* , mais aucun de ces tests n'a été concluant. C'est pour ces raisons que nous avons choisit de changer d'organisme et d'étudié en partie le rôle de TET chez *H.volcanii* par le biais de cette souche délété d'un des gènes TET.

Chapitre 11

Etude du rôle de TET chez l'archée halophile *Haloferax volcanii* par la détermination du phénotype d'un mutant délété d'un des gènes codant pour la protéine TET

Le but de cette étude est de pouvoir trouver, par la comparaison phénotypique de la souche sauvage (noté WT pour "wild-type") et d'un mutant délété d'un des deux gènes de la protéase TET (noté CN5 ou parfois Δ TET) de *H.volcanii*, des informations sur le rôle ou l'action de TET dans la physiologie des archées.

11.1 Résultats

11.1.1 Influence de la présence de la protéase TET au cours de la croissance

Notre laboratoire dispose d'une souche sauvage et d'une souche mutante avec un des deux gènes de TET délété de l'organisme *H.volcanii*.

Les deux souches sont cultivées en parallèles, un échantillonnage est effectué sur les deux culture à DO 0,9. Les cellules sont ensuite regardé au microscope par contraste de phase (voir figure 11.1) afin d'observer des différences morphologique entre les deux souches. Ces deux souches pléomorphes, ne semble pas avoir de différences morphologiques drastiques.

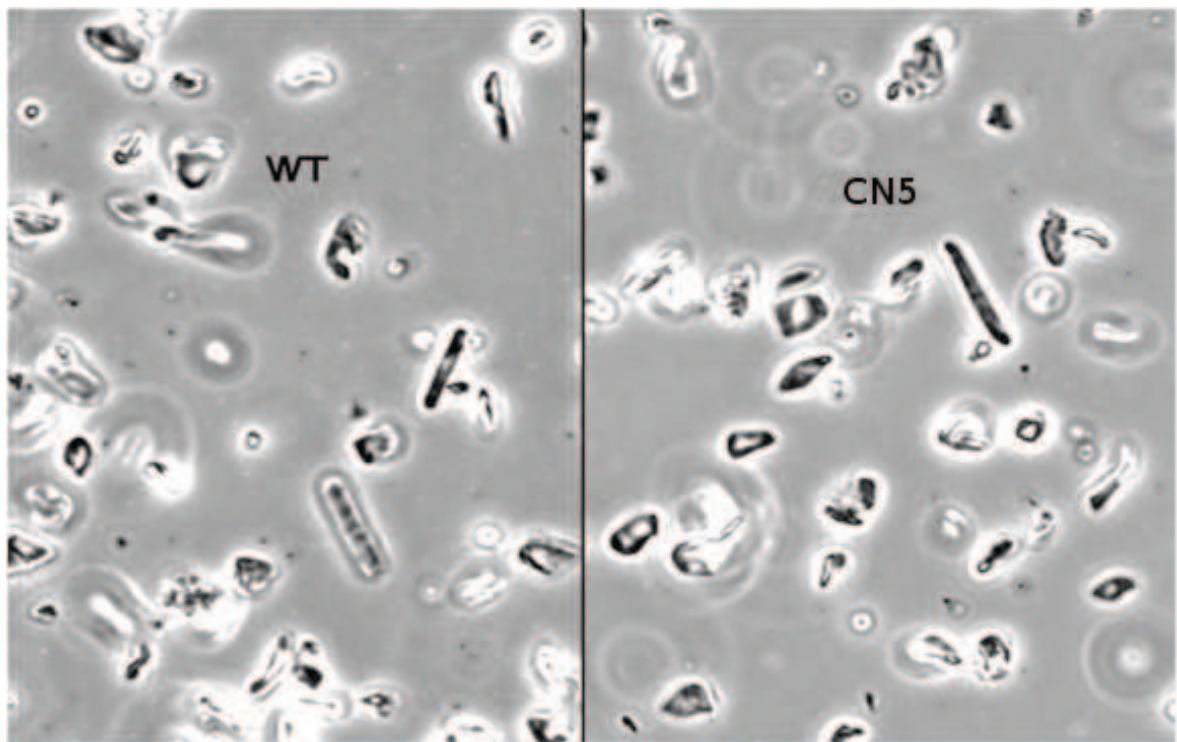


FIGURE 11.1 – **Comparaison morphologique des deux souches.** Micrographie par contraste de phase de la souche sauvage *H.volcanii* (WT) à gauche et de la souche mutante délété d'un gène TET d'*H.volcanii* (CN5) à droite.

La vitesse de croissance dans leur milieu optimal (milieu Hv-YPC voir Matériel et Méthodes pour ça composition) a aussi été comparée entre la souche sauvage et la souche mutante (voir résultats figure 11.2).

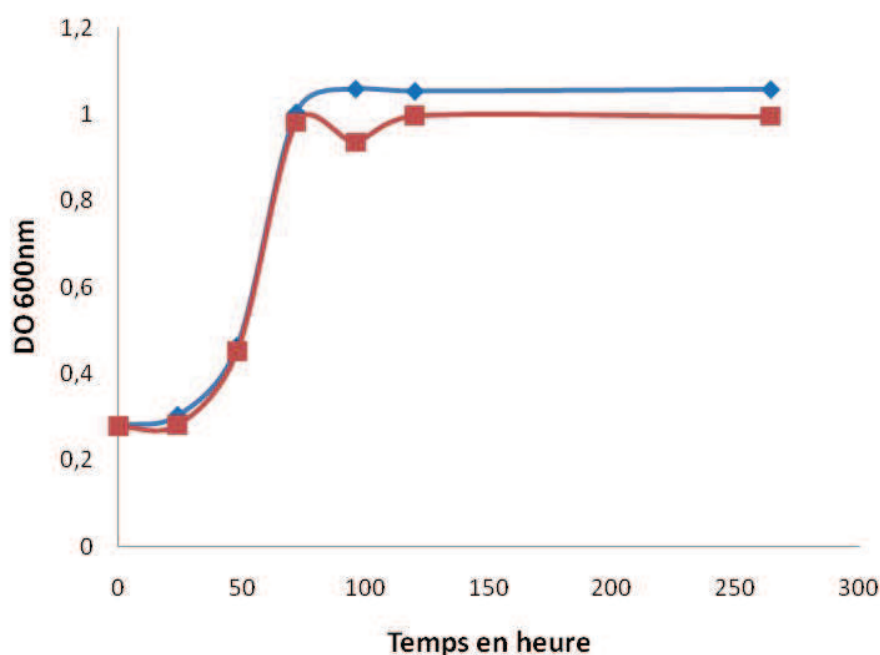


FIGURE 11.2 – Suivi et comparaison de la croissance en condition optimale de l'organisme *H.volcanii* et du mutant CN5. En blue Hv WT en rouge Hv CN5, la croissance dans le milieu HvYPC (voir Matériels et Méthodes) est suivit par mesure de la densité optique à 600nm. L'expérience a été répété de multiple fois et l'apparition du décrochage en fin de phase exponentiel est répétitif.

Nous pouvons voir une croissance similaire tout au long de la phase exponentielle de croissance, puis une entrée en phase stationnaire plus précoce et à DO plus faible (environ 10%) pour la souche mutante. Il s'avère donc que la présence de la protéase TET n'est pas indispensable lors de la croissance cellulaire, excepté lors de l'entrée en phase stationnaire. Il est donc possible que cet protéase n'est pas un rôle primordial à jouer au cours de la croissance, ou bien le fait que seulement une des 2 protéases TET de cet organisme soit délétée laisse à l'organismes des possibilités de compensations, pour pallier l'activité manquante. Il est possible par contre, que l'activité de cette

protéase intervient en début de phase stationnaire (DO_{maximum} toujours inférieur de 10% pour la souche mutante).

L'entrée en phase stationnaire est due à un appauvrissement du milieu en nutriments. Les cellules pour "continuer" à se multiplier vont régénérer les protéines inutiles de leurs cytoplasme afin de fournir à leur métabolisme des acides-aminés. Il devient donc intéressant de tester différentes compositions nutritionnelles du milieu de croissance (voir chapitre 11.1.4) afin de voir si un phénotype différent entre la souche mutante et la souche sauvage se dégage. En effet cette entrée légèrement plus basse (en DO) en phase stationnaire laisse penser que cette peptidase pourrait jouer un rôle dans le métabolisme.

11.1.2 Influence de la présence de la protéase TET au cours d'un stress Hypo-salin

Il est possible que les amino-peptidases jouent un rôle de contrôle qualité en association avec le protéasome pour la dégradation des protéines défectueuses générées par exemple lors de stress. Nous avons vu précédemment que le protéasome, ainsi que les protéines activatrices du complexe protéasome (système PAN) étaient induites lors de stress salins (voir figure 10.3). L'absence d'une des protéases TET pourrait ainsi rendre la réponse de l'organisme face au stress moins performante, ralentissant la croissance ou compromettant sa survie.

Les deux souches (WT et CN5) ayant une division cellulaire et une croissance proche avec une même DO de départ, sont soumises à un stress hypo-salin par dilution. Plusieurs concentrations finales en NaCl extracellulaire après dilution ont été testées (1,5M et 0,9M). La vitesse de croissance cellulaire des deux souches est ensuite comparée à la DO (voir résultats figures 11.3).

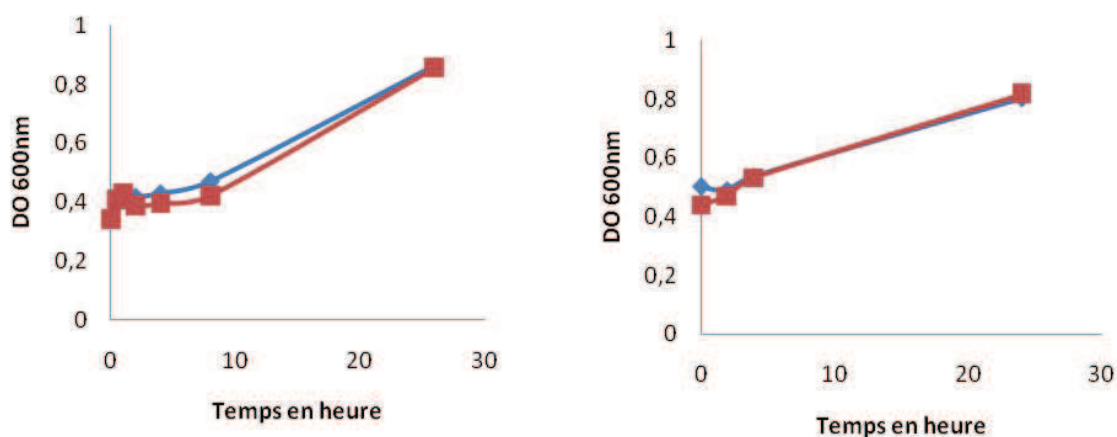


FIGURE 11.3 – **Comparaison de la croissance des deux souches lors de choc hypo-salin.** En bleu Hv WT en rouge Hv CN5, la croissance est suivit par densité optique à 600nm. A gauche et à droite les cultures sont respectivement soumises a un stress hypo-salin par dilution de culture en phase de croissance exponentielle avec du milieu sans NaCl à une concentration finale en NaCl extracellulaire de 1,5M et 0,9M respectivement.

Quel que soit l'intensité du stress, les souches WT et CN5 croient de manière identique. Donc l'absence d'une seule de ces protéines TET n'impacte pas la croissance et la survie de l'organisme en présence de stress hypo-salins (il est a noté qu'exactement le même résultats a été obtenu en présence d'un choc thermique, mais ces données ne figure pas dans cette thèse car elles n'ont pas été répétées). En conclusion, son action ne semble pas nécessaire à la réponse à ces types de stress environnementaux.

11.1.3 Influence de la présence de la protéase TET au cours de stress nutritionnel

Il a été possible de voir une légère dégradation de la capacité de croissance lors de l'entrée en phase stationnaire du mutant dans des conditions de croissance optimales (voir résultats en rappel sur figure 11.4.). Il est intéressant d'étudier la capacité du mutant CN5 à surmonter un déficit nutritionnel , par sa culture dans des milieux "minimums" ou des milieux définis.

Pour cette expérience, trois types de milieu avec différents éléments nutritionnels ont été utilisés : le milieu Hv-YPD est le milieu optimal et est composé de nutriment de type peptone et extrait de levure ; le milieu Hv-Peptone ne sera composé que de nutriment de type peptone et donc dépourvu d'extrait de levure, le milieu Hv-aa, est un milieu minimum dont les nutriments sont des acide aminé et la source d'énergie est du glycérol et du sodium succinate (pour plus de précision sur la composition des milieux se référer au Matériels et Méthodes).

Des cultures de chaque souche (WT et CN5), ayant la même DO de départ sont cu-lottées, puis les cellules sont re-suspendues avec les différents milieu nutritionnel. La croissance des différentes souches est suivit par DO à 600nm et les résultats obtenus sont présentés sur la figure 11.4.

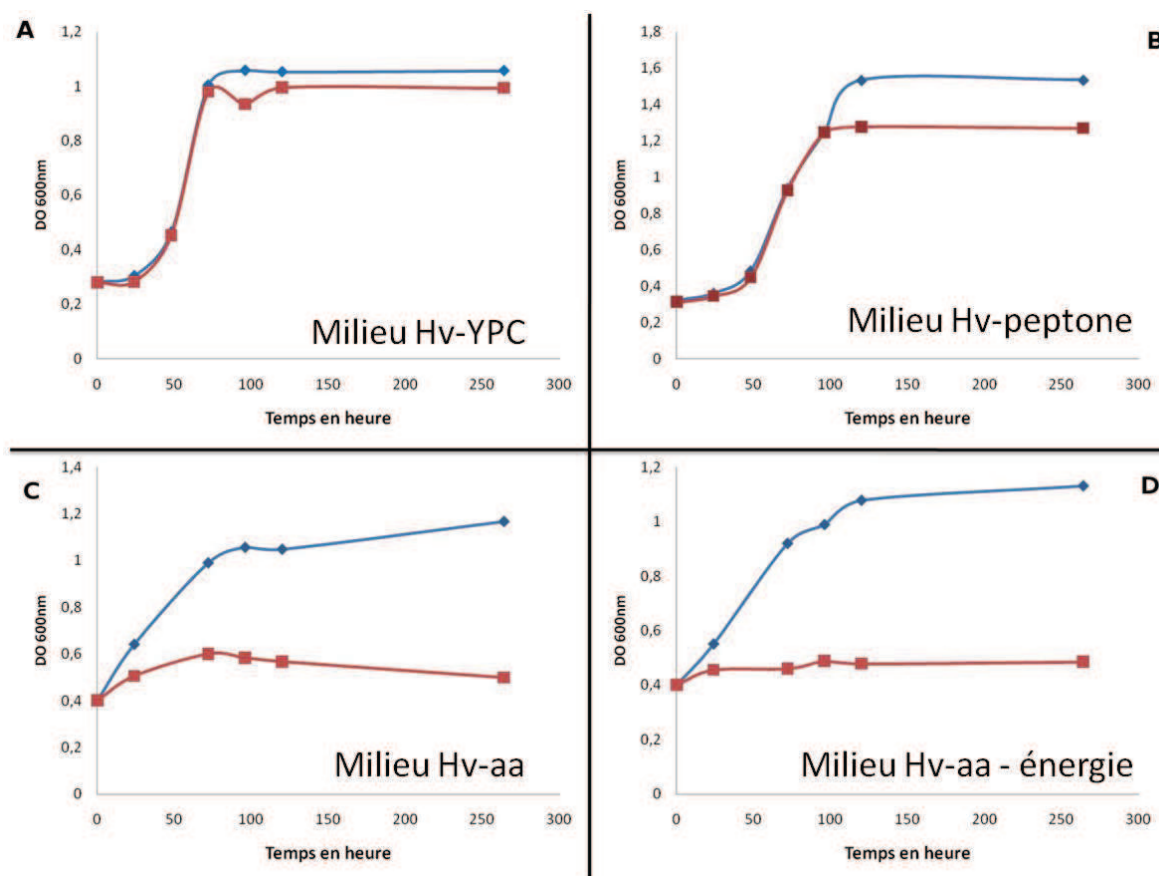


FIGURE 11.4 – Comparaison de la croissance de *H. volcanii* WT et CN5 en fonction de différents milieux nutritionnels. En bleu Hv WT en rouge Hv CN5. **A.** Courbe de croissances des deux souches en conditions nutritionnelles normales (milieu HvYPD). **B.** en présence d'un milieu de cultures Hv-Peptide. **C.** en présence d'un milieu Hv-AA. **D.** en présence d'un milieu Hv-AA sans énergie (sans le glycérol et le sodium succinate). Pour réaliser cette expérience, une culture de *H. volcanii* WT et une de *H. volcanii* CN5 sont culottées et divisées en 4, les différents culots sont ensuite re-suspendus dans les différents milieux nutritionnels.

En présence de source de nutriment composée seulement de "peptide" (le milieu normal est composé d'un mélange de peptide et d'extrait de levure), il est possible de voir que le mutant n'arrive pas à obtenir une DO équivalente à celle de la souche WT en début de la phase stationnaire, comme lors d'une croissance en milieu "normal" (Hv-YPD). En effet la phase stationnaire débute à une DO 20% plus faible chez le mutant que chez la souche sauvage. Il semblerait donc que cette peptidase TET joue un léger rôle en condition de carence (due à la phase stationnaire où les nutriments

deviennent rares) et plus particulièrement en présence de petit peptides et d'acide aminé dans le milieu nutritionnel (milieu Hv-peptone).

La présence d'acide aminé comme seule source de nutriment révèle un phénotype totalement différent entre les deux souches. Que se soit avec ou sans apport d'énergie (voir résultats figure 11.4 C et D) , il est possible de voir que la présence de cette protéase TET est essentielle pour maintenir la croissance cellulaire. Il semble tout de même qu'un apport énergétique (glycérol + sodium succinate) permette pendant un laps de temps assez court de maintenir une légère croissance.

Ce résultat va à l'encontre de ce que nous attendions : TET étant une amino-peptidase dont le rôle est de dégrader des peptides en acides-aminés (donc générer des acides-aminés) est paradoxalement indispensable pour la croissance cellulaire lorsqu'il n'y a que des acides-aminés comme source de nutriment. Cette protéase pourrait donc jouer un autre rôle permettant aux cellules d'utiliser ces acides aminés présents dans le milieu extracellulaire.

11.1.4 Mesure de l'activité amino-peptidasique totale et importance de la peptidase TET

Nos études précédentes montrent que nous disposons d'un phénotype différents qui distingue la souche WT de la souche Δ TET. Ce phénotype apparaît lorsque les deux souches sont en présence d'acides-aminés comme source de nutriment dans le milieu extracellulaire. En conséquence, cette condition de culture a été choisie pour déterminer les profils d'activités enzymatiques, car dans ces conditions la présence de TET semble primordiale. Donc normalement dans ces conditions l'induction, l'accumulation ou l'activité des protéases TET doit être favorisé chez la souche sauvage, ce qui pourrait nous permettre de mettre en évidence en la comparant avec l'activité amino-peptidasique totale du mutant, une augmentation d'activité amino-peptidasique due à l'activité de TET.

Pour cela les deux souches ont été cultivées en conditions normales, puis culottées, re-suspendues dans un milieu Hv-YPC AA et cultivées pendant 24 heures à 45°C (température optimum). Les cultures sont à nouveau culottées, puis lysées et l'activité enzymatique totale est mesurée après avoir normaliser les échantillons en fonction de la concentration protéique totale (par test Bradford et dilution). Ne connaissant pas la spécificité de la TET de *H.volcanii*, tout les substrats disponibles couplés à l'AMC ont été testés. De plus une combinaison avec différents cofacteurs métalliques (calcium, cuivre, cobalt, magnésium, fer, zinc) a été réalisé. Parmi tout ces cofacteurs, seul le cobalt permet d'obtenir une activité enzymatique différente de celle de l'échantillon contrôle sans cofacteur (résultats non montrés), une sélection des résultats percutant est présenté figure 11.5.

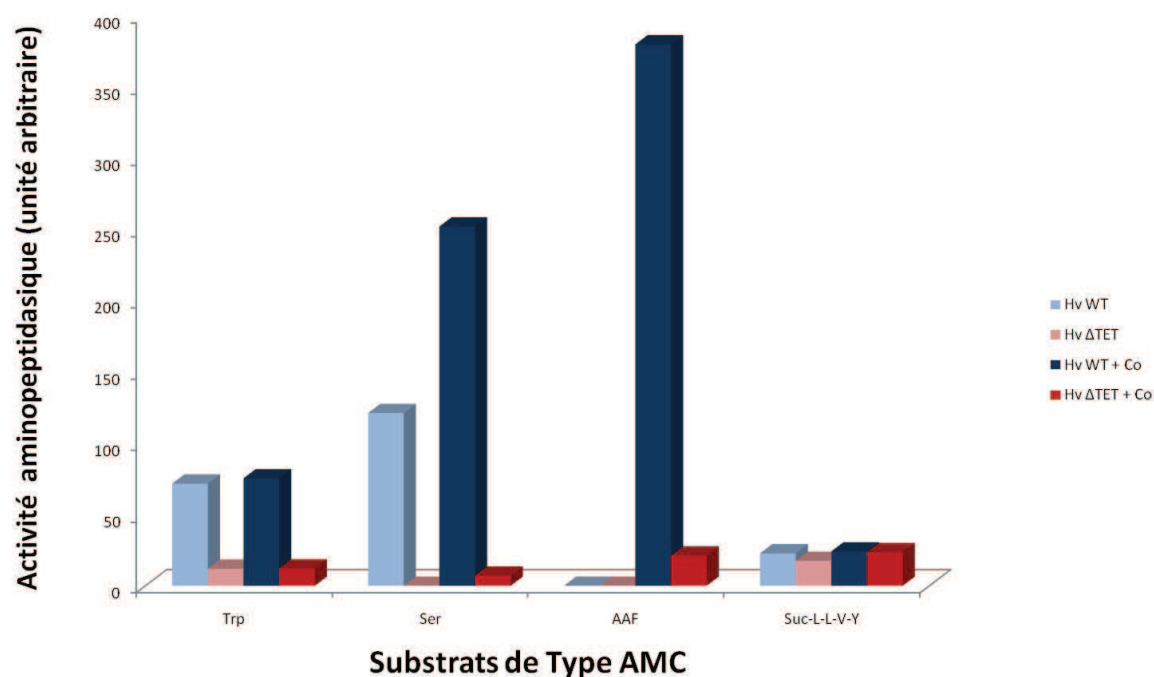


FIGURE 11.5 – **Détermination d'un profil d'activité amino-peptidasique en condition de carence nutritionnelle.** En blue Hv WT en rouge Hv CN5. En clair (bleu clair et rouge clair) test d'activité sans cofacteur métallique; en foncé, test d'activité en présence de cobalt (Co). Le test d'activité avec le substrat Suc-L-L-V-Y est un contrôle positif sur l'activité endopeptidasique totale. Les autres substrats sont de gauche à droite des substrats fluorogéniques (couplé à l'AMC) permettant de doser l'activité amino-peptidasique : Trp = Tryptophane-AMC ; Ser = Serine-AMC ; AAF = Alanine-Alanine-Phénylalanine-AMC. Voir chapitre 14.5 pour la méthode de mesure de l'activité. Sont entourés en rouge les substrats utilisés dans la suite de l'étude.

Il est possible de voir que l'activité endo-peptidasique (substrat Suc-L-L-V-Y) est quasiment la même pour les deux souches et qu'elle n'est pas sensible au cobalt. Ce test nous sert de contrôle positif.

Quelques soit le substrat utilisé pour mesurer l'activité amino-peptidasique, en présence ou non de cobalt, ils est possible de voir dans ces conditions que l'activité amino-peptidasique totale des échantillons protéiques provenant de la souche mutante est largement inférieure à celle de la souche sauvage.

Il est possible grâce à ce test d'identifier trois différent profil d'activité amino-

peptidasique, pouvant être associé à une ou plusieurs peptidases. Dans le chapitre 12.1.2, il sera démontré que l'activité amino-peptidasique mesurée dans les extrait cellulaire ne correspond pas à l'activité de la peptidase TET.

L'activité amino-peptidasique mesurée pour le substrat Trp-AMC, montre que les peptidases qui entre en jeu pour le dégrader ne sont pas sensible au cobalt ; pour le substrat Ser-AMC, l'activité est multiplié par deux en présence du cobalt ; pour le substrat AAF-AMC, composé de trois acides-aminés et permettant de visualisé une activité amino-peptidasique sur une "chaîne d'acide aminés", la présence du cobalt est nécessaire. Même si trois profil d'activité en fonction du cobalt apparaissent, il se peut que se soit la même protéase qui possède une affinité différentes en fonctions du substrat et de la présence de cofacteur.

Il est à noté que ces trois substrats en présence de cobalt seront utilisés par la suite pour toutes les expériences d'activité enzymatique.

Il est ainsi possible de voir une forte différence d'activité amino-peptidasique entre les deux souches lors de ce stress nutritionnel. Cette différence d'activité semble être due à l'absence d'activité de la peptidase TET (bien que nous verrons par la suite au chapitre 12.1.2 que cette activité mesuré n'est surement pas due à la peptidase TET). Pour validé cette hypothèse, la mesure de l'activité amino-peptidasique dans les fractions protéiques en condition optimale de croissance (milieu Hv-YPC), là où TET n'est pas nécessaire, a été réalisé et devrait permettre de définir si c'est bien l'absence (ou la présence de TET) qui favorise cette différence de profil d'activité (voir résultats figure 11.6).

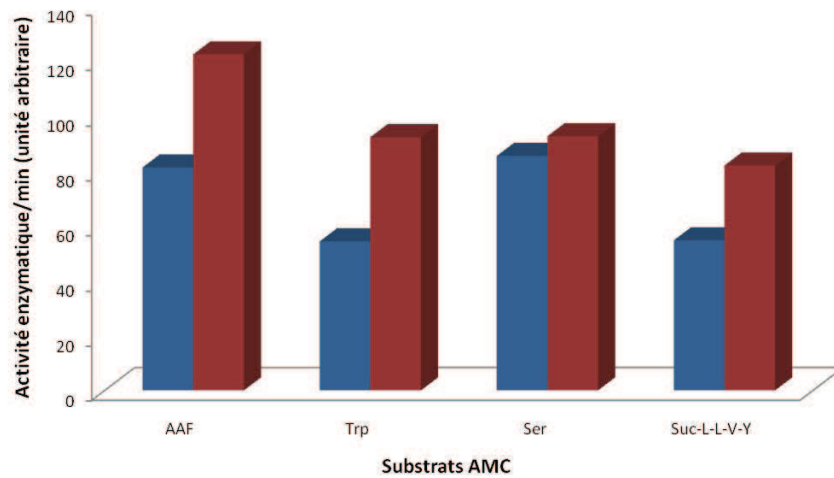


FIGURE 11.6 – Mesure de l’activité amino-peptidasique en milieu normal HvYPC. En présence de Cobalt. En blue Hv WT en rouge Hv CN5. Le test d’activité avec le substrat Suc-L-L-V-Y est un contrôle positif sur l’activité endopeptidasique totale. Les autres substrats sont de gauche à droite des substrats fluorogéniques (couplé à l’AMC) permettant de doser l’activité amino-peptidasique : AAF = Alanine-Alanine-Phénylalanine-AMC ; Trp = Tryptophane-AMC ; Ser = Serine-AMC. Voir chapitre 14.5 pour la méthode de mesure de l’activité.

En condition nutritionnelle ”optimale” contrairement à la condition de carence nutritionnelle en présence uniquement d’acides-aminés vue précédemment, il est possible de voir que l’activité amino-peptidasique de la souche sauvage et de la souche mutante sont du même ordre de grandeur et même que l’activité amino-peptidasique du mutant est légèrement supérieure à celle de la souche sauvage et cela quelque soit le substrat utilisé.

Ces résultats ne permettent pas de confirmer l’hypothèse avancée dans le paragraphe précédent, qui stipulait que la différence d’activité mesurée entre les différentes souches en conditions de carence nutritionnelle, étaient due à la présence du gène TET. Car en effet, un profil d’activité similaire à celui observé sur la figure 11.5 aurait pu prouvé que l’absence de TET ”amputé” l’activité amino-peptidasique totale des cellules. C’est le cas en conditions de carences nutritionnelles, mais ce n’est pas le cas en conditions de croissances optimales. Ainsi, il est possible que ce profil d’activité amino-

peptidasique "amoindrit" chez la souche mutante en conditions de croissance dans un milieu défini composé uniquement d'acides aminés soient due au fait que les cellules rentrent dans une sorte de phase de latence. Pendant cette phase de latence la plupart des amino-peptidases cytosolique pourraient être dérégulées ou désactivées afin de stopper le métabolisme (que se soit au niveau de la production et de la destruction).

11.2 Discussion

Il avait été montré que la protéase TET de *H.marismortui*, avait une forte affinité pour les substrats Glutamine, Lysine, Leucine, Méthionine, Sérine et Arginine. Dans notre étude sur les extraits protéiques seuls les substrat Ser-AMC et Trp-AMC permettent d'obtenir un profil d'activité sans cobalt [78]. Par contre la présence de ce cofacteur métallique, permet d'obtenir une activité amino-peptidasique sur presque l'ensemble des substrats et en particulier sur le substrats AAF-AMC, mimant un peptide plus long. L'intérêt de choisir un peptide plus long est de cibler des peptidases pouvant digérer des poly-peptides, comme la peptidase TET.

Lors de stress nutritionnel, où les cultures n'ont que des acide-aminé comme source de nutriment, il est clair le gène TET délété est essentiel pour le maintien de la croissance. Il est à noter qu'il ne semble pas y avoir de redondance fonctionnelle entre les deux TET. Si cette peptidase est essentielle dans ce type de stress nutritionnel, elle devrait être produite en forte quantité, accumulée, activée ou voir son rendement optimisé.

En condition de croissance normale, cette protéase n'étant pas primordiale et il est intéressant de trouver un profil d'activité amino-peptidasique totale proche pour les deux souches. Il semble fort probable qu'en condition optimale, cette peptidase n'ait pas un rôle clé à jouer, ou que d'autres peptidases prennent le relais et compensent l'activité manquante.

Le profil de croissance et d'activité aminopeptidasique obtenue en condition de carence nutritives définie en présence d'acide aminé, et plutôt paradoxal pour une amino-

peptidase. En effet comment expliquer que l'absence d'une peptidase permettant de générer des acides aminés, ne permet pas aux cellules de croître dans un environnement où il y a déjà énormément d'acide aminé et donc dans une condition environnementale où sa présence n'est pas supposé nécessaire ?

Une des explications pourrait être, qu'en présence d'acide aminé, l'appareil traductionnel s'emballe, génère de nombreuses protéines défectueuses et que le système contrôle qualité incomplet (système PAN-protéasome + TET en aval) n'arrive plus à compenser l'absence de TET et laisse s'accumuler dans le cytoplasme des protéines défectueuses et "toxique". Cette théorie est en désaccord avec les études de croissance qui montre seulement un arrêt de la croissance et non une forte mortalité due à la toxicité de l'accumulation des protéines défectueuses dans le cytoplasme. De plus, cette explication, n'indique pas pourquoi il y a un léger décrochage en début de phase stationnaire en conditions normales et en milieu ne fournissant que de la peptone.

Une deuxième explication est présentée dans les figures 11.7 et 11.8. TET pourrait jouer un rôle en aval du protéasome pour "finir" la dégradation des protéines en acides aminés. Mais aussi TET pourrait avoir un rôle dans le transport de nutriment et en particulier pour les petits peptides et les acides aminés. En effet certains transporteurs sont activé par la présence de protéase cytosolique [128], il est possible aussi que leur production soit contrôlée ou régulée à un certain niveau uniquement par la protéase TET et donc stoppée en cas de délétion (mutant CN5). Ainsi l'absence de l'activité de la protéase TET est compensable dans un milieu fournissant peu de petits peptides et d'acide aminés comme le milieu Hv-YPG, mais plus le rapport en acide aminé et petit peptide augmente comparé au reste des nutriments (exemple pour le milieu peptone) plus la quantité de nutriment "utilisable" diminue (ils ne peuvent plus entrer car les transporteurs ne sont pas activé du fait de l'absence de cette protéase) et donc plus vite la croissance s'arrête. L'effet est particulièrement visible dans un environnement ne fournissant que des acides aminés, où aucun nutriment n'est capable de passer la membrane. Dans ce cas les cellules s'arrête de croître directement, se mette en état de latence en attendant l'arrivée de nouveau nutriment.

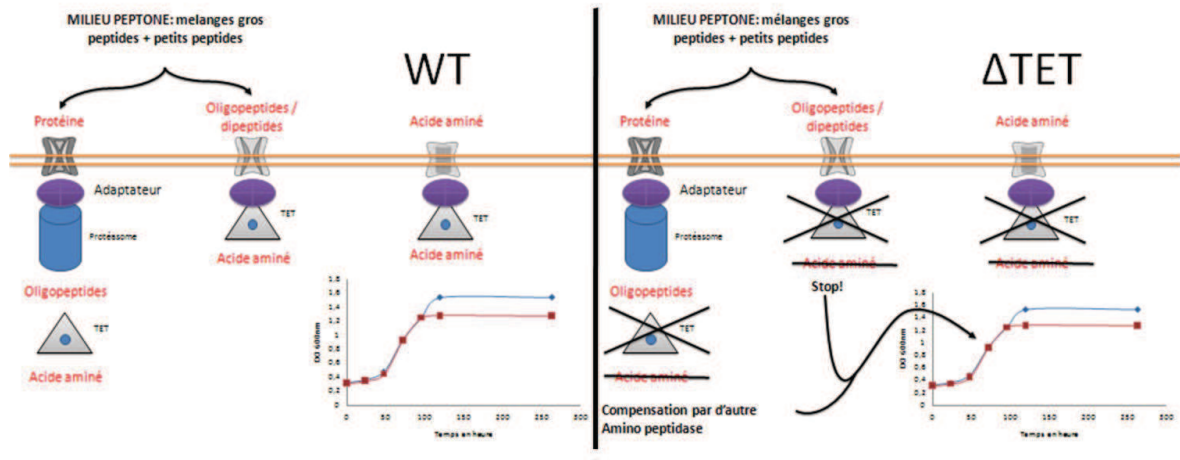


FIGURE 11.7 – Figure hypothétique traçant le rôle de TET en présence de peptone comme unique source de nutriment. A gauche et à droite respectivement : mécanisme hypothétique du rôle de la peptidase TET chez la souche sauvage et la souche mutante ΔTET de *H.volcanii*. Trois types de transporteurs membranaires sont présent chez les archées, un type pour les protéine, un type pour les oligopeptides et un type pour les acides aminés. Nous faisons l'hypothèse qu'un système contrôle soit en association avec ces transporteurs, permettant de les produire ou de les activer et de contrôler ou dégrader les substrats transportés. Pour la souche délété du gène TET, dans un milieu nutritionnel composé de mélange de gros et de petits peptides, les gros peptides peuvent être transportés librement et être dégradés dans le cytoplasme par le protéasome (par exemple) et fournir des acides aminés au métabolisme, par contre pour les petits peptides sans la présence de TET le transporteur n'est pas activé et ne peuvent donc pas être assimilés par les cellules. La légère différence de croissance s'explique donc par le fait que la souche sauvage a accès à plus de nutriment que la souche mutante.

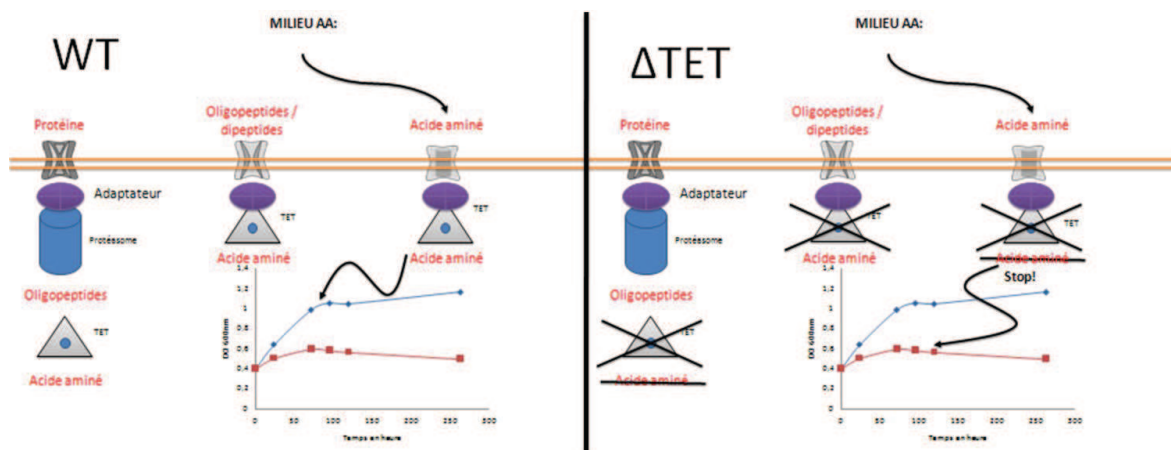


FIGURE 11.8 – **Figure hypothétique traçant le rôle de TET en présence d'acides aminés comme unique source de nutriment.** Comme précédemment, trois types de transporteurs membranaires sont présent chez les archées, un type pour les protéine, un type pour les oligopeptides et un type pour les acides aminés. Nous faisons l'hypothèse qu'un système contrôle soit en association avec ces transporteurs, permettant de les produire ou de les activer et de contrôler ou dégrader les substrats transportés. Pour la souche délété du gène TET, dans un milieu nutritionnel composé de mélange d'acides aminés, sans la présence de TET le transporteur n'est pas activé et les cellules ne peuvent donc pas être assimilés les acides aminés pour leur métabolisme. Sans source de nutriment les cellules s'arrêtent de croître et entre dans une phase de dormance (arrêt des processus cellulaire et donc arrêt des acteurs de la protéolyse).

Nous ne disposons pas d'un double mutant KO des deux gènes TET différents chez *H.volcanii*, ni un KO du gène TET2. Nous n'avons pas non plus d'anticorps ciblant les TET de *H.volcanii*. Par contre nous savons que l'organisme *H.salinarum* ne dispose que d'une seule TET, et nous avons pour cette protéine un anticorps spécifique. Il devient donc intéressant de passer chez cet organisme pour continuer l'étude du rôle de l'amino-peptidase TET.

Chapitre 12

Etude du rôle de TET chez l'archée halophile *Halobacterium salinarum*

L'organisme *H. salinarum* est un organisme plus adapté à l'étude du rôle de TET, en effet cet organisme, contrairement à *H. volcanii*, ne possède qu'un seul gène de TET. De plus, nous connaissons et maîtrisons plus précisément les conditions d'application de stress pour cet organisme et en particulier les conditions de stress hypo-salins et thermiques (voir première partie de cette thèse). Enfin nous possédons des anticorps spécifiques de cette protéase, ainsi que des outils d'analyses de protéines calibré pour cet organisme comme le gradient de sucrose. Par contre nous ne disposons pas d'un mutant KO du gène TET chez cet organisme.

12.1 Résultats

12.1.1 Les différentes formes de TET dans le cytoplasme

Dans la littérature, la protéase TET est décrite comme une particule à 12ss formée d'assemblages de dimères [81] [80], qu'en est-il in vivo chez les archées halophiles ? Pour étudier l'état d'assemblage de TET, il a été réalisé au laboratoire une calibration

de gradient de sucrose 5-20% au sel (3,4M KCl) avec différents complexes protéiques de poids moléculaires connus comme la malate déshydrogénase ou le protéasome 20S. Des cultures de *H.salinarum* en phase exponentielle de croissance sont culottées, re-suspendues dans du tampon de lyse à 3,4M KCl, puis lysées par sonication. L'ADN est ensuite dégradé par l'action d'une DNase pendant 1 heure à température ambiante, puis une centrifugation de 45 minutes à 30 000g permet l'obtention d'un surnageant protéique (appelé S30) "purifié" de l'ADN et des membranes. Enfin une partie du surnageant est déposé sur un gradient de sucrose 5-20% (5-20% de sucrose mélangé au tampon de lyse) et la séparation se fait pendant 20 heures à 160 000g. Enfin le gradient est séparé en 15 fractions, dont la fraction contenant les molécules les plus légères est la fraction 1 et celle contenant les molécules les plus lourdes la fraction 15 (voir résultats figure (voir figure 12.1)).

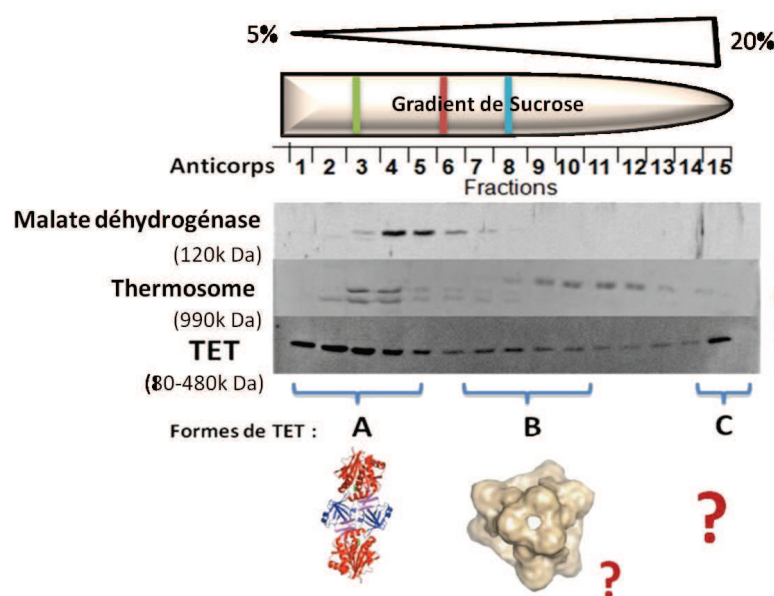


FIGURE 12.1 – Calibrage du gradient de sucrose, les trois formes de TET de *H.salinarum* in vivo. En haut, exemple de complexes protéiques séparés par gradient de sucrose et révélés par Western-blot. En bas, la position supposée dans le gradient des différentes formes de TET : fractions 1-5 TET dimérique, 7-10 TET 12ss, 15 forme de TET inconnue surement associée à des complexes de haut poids moléculaire.

Dans ces conditions expérimentales la figure montre que la forme majoritaire de TET présente dans le cytoplasme est une forme de bas poids moléculaire dans les fractions 1 à 6, pouvant correspondre à la forme dimérique. Une forme de plus haut poids moléculaire se situe autour des fractions 7 à 10 pouvant correspondre à la forme "active" à 12ss. Enfin dans la fraction 15, une forme de type inconnu surement associée à des complexes de haut poids moléculaire est détectée.

Il est intéressant de voir que la forme supposée active n'est pas représentée de façon majoritaire dans la cellule. Il devient donc intéressant pour comprendre le rôle de cette protéase, de trouver les conditions qui permettent le recrutement de cette forme dite "active".

12.1.2 Contribution de la protéase TET dans l'activité aminopeptidasique totale

L'activité amino-peptidasique totale a été testée sur une culture en début de phase exponentielle (DO à 600nm de 0.6) avec la même sélection de substrats de type AMC que lors de l'étude effectuée chez *H.volcanii* (voir chapitre 11.1.4). Pour cela des cultures en phase exponentielle de croissance ont été culottées, lysées et l'activité aminopeptidasique a été mesurée sur les extraits protéiques. Les résultats sont présentés sur la figure 12.2.

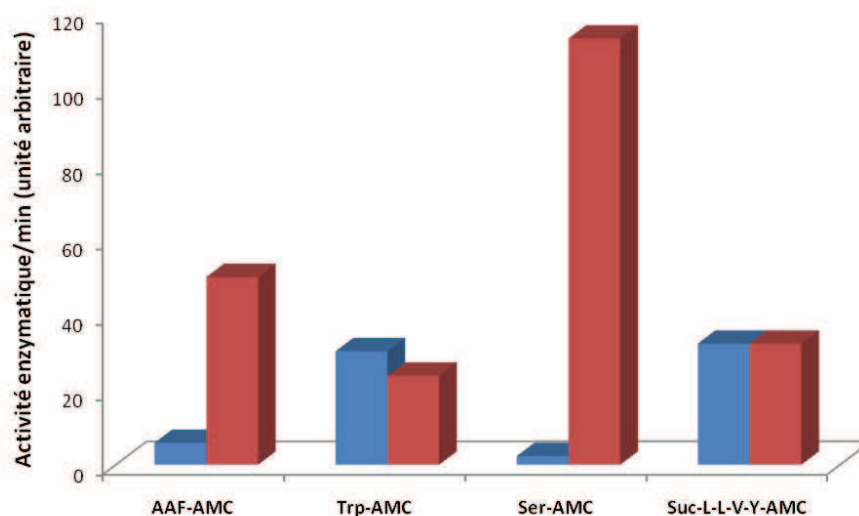


FIGURE 12.2 – Mesure de l'activité amino-peptidasique totale chez l'organisme *H.salinarum*. En bleu mesure sans cofacteur, en rouge mesure avec du Cobalt. Des cultures en phase exponentielle de croissance (DO 0.6 à 600nm) ont été culottées, lysées et l'activité aminopeptidasique a été mesurée sur les extraits protéiques avec les substrats AAF, Trp, Ser et Suc-L-L-V-Y couplés à l'AMC en présence ou non du cofacteur métallique cobalt.

Comme pour les expériences réalisées chez *H.volcanii*, l'activité amino-peptidasique sur les substrats Ser et Trp est activée par la présence du cofacteur métallique (Cobalt). Le substrat avec lequel l'activité aminopeptidasique est la plus importante et qui sera choisi pour le reste de l'étude est le substrat Ser-AMC.

Une partie des extraits protéiques a ensuite été séparée par gradient de sucrose 5-20%. Le gradient est ensuite fractionné en 15 fractions. Après fractionnement sur gradient de sucrose, chaque fraction peut être divisée, une partie va servir à la détermination de la localisation de la protéase TET par immuno-révélation et l'autre partie sera utilisée afin de mesurer l'activité amino-peptidasique. L'objectif est de tenter de corréler la présence de la protéase TET dans les fractions avec le profil d'activité amino-peptidasique (résultats figure 12.3).

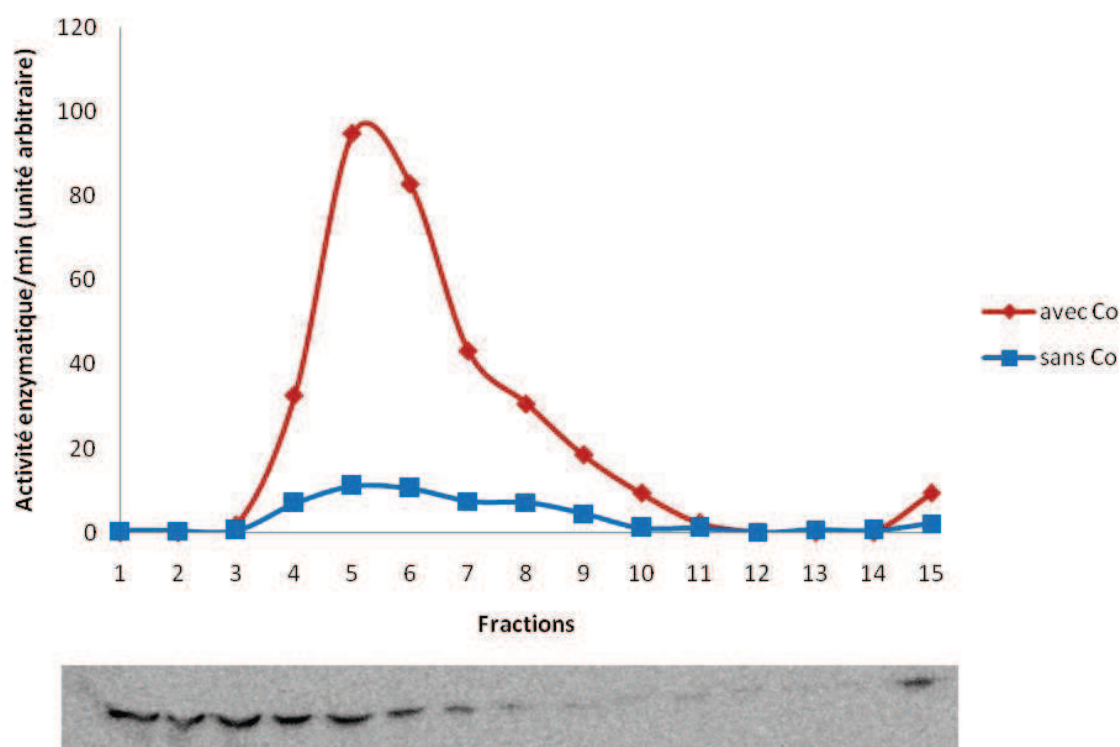


FIGURE 12.3 – Correspondance entre la localisation de l'activité aminopeptidasique dans le gradient et la place de la protéase TET de *H. salinarum* au cours de la phase exponentielle. En haut, activité Ser-AMC réalisée sur un des extraits protéiques de *H. salinarum* après séparation par gradient de sucre 5-20%, en bleu, activité sans cofacteur, en rouge avec du Cobalt. En bas, révélation par western blot de la localisation de TET dans le gradient.

La figure 12.3 montre que toute l'activité aminopeptidasique semble être cobalt-dépendante, en effet la présence de cobalt augmente de manière significative l'activité aminopeptidasique dans chaque fraction où elle était présente.

Par contre en comparant la localisation de TET et la localisation de l'activité aminopeptidasique dans le gradient, il est clair que l'on ne les retrouve pas dans les mêmes fractions, en effet le pic d'activité se trouve aux alentours des fractions 5-6 et s'étale de la fraction 3 à la fraction 10.

De plus les protéases mises en jeu pour cette activité sont sensibles aux drogues inhibitrices de metallo-protéase "amastatine" et "bestatine" (données non montrées); la protéase TET est sensible à ces drogues, mais une autre protéase non assignée de

la famille M29 l'est aussi (voir tableau 12.4. Il est donc fort probable, que l'activité amino-peptidasique mesurée corresponde à l'activité de cette protéase et non due à l'activité de la protéase TET.

Metalloprotéase chez <i>H.salinarum</i>				
clan	Famille	Nom	métaux	fonction connue
MA	M3	oligopeptidase F	Zn	intracellular degradation of oligopeptides
MA	M32	carboxypeptidase Taq	Zn *2	Taq peptidase (except proline)
MA	M48	Mername-AA052 peptidase	Zn	C-terminal motif known as CAAX
MA	M48	3x protéase non assigné	Zn	
MA	M54	archaeolysin	Zn?	
MG	M24	methionyl aminopeptidase 2	2*Co	N-terminal methionine
MG	M24	PH0974 dipeptidase	2*Co	
MG	M24	subfamily M24B unassigned peptidases	2*Co	
MH	M20	family M20D unassigned peptidases	zn	carboxypeptidase
MH	M28	subfamily M28E unassigned peptidases x2	Zn	leucyl aminopeptidase + Nter
MH	M42	TET aminopeptidase	Zn ou Co	N ter
MJ	M38	family M38 non-peptidase homologues x8	Zn*2	dipeptide avec Asp
MK	M22	Kae1 putative peptidase	Zn ?	endopeptidase
MK	M22	family M22 non-peptidase homologues	Zn ?	endopeptidase
MM	M50	MjS2P-type peptidase	Zn	peptidase N ter pour membrane
MM	M50	family M50 non-peptidase homologues x2	Zn	peptidase N ter pour membrane
MM	M50	subfamily M50B unassigned peptidases x3	Zn	peptidase N ter pour membrane
MO	M23	subfamily M23B non-peptidase homologues	Zn	N-acylmuramoyl-Alaé du peptidoglycane
MO	M23	subfamily M23B unassigned peptidases	Zn	N-acylmuramoyl-Alaé du peptidoglycane
MP	M67	JAMM-like protein (<i>Archaeoglobus</i> -type)	Zn	isopeptidase cleaving Lys48-linked tetra-ubiquitin and Lys63-linked polyubiquitin chains
MP	M67	subfamily M67A unassigned peptidases	Zn	isopeptidase cleaving Lys48-linked tetra-ubiquitin and Lys63-linked polyubiquitin chains
MQ	M29	family M29 non-peptidase homologues x2	Co	
MQ	M29	family M29 unassigned peptidases x2	Co	large spécificité de substrat (+spé :Leu, Val, Phe or Tyr) sensible a la bestatine et amastatine
M	M79	family M79 unassigned peptidases x2	nd	C ter "aaX"
M	M82	PrsW peptidase	nd	nactivates the anti-sigma factor RsiW

FIGURE 12.4 – Tableau récapitulatif des métallos-protéases référencées chez *H.salinarum*.

12.1.3 Accumulation et recrutement de la forme 12 sous-unités de la protéase TET au début de la phase stationnaire

Lors de l'étude phénotypique du mutant CN5 chez *H.volcanii*, il a été possible de voir une légère différence de capacité de croissance, avec une DO plus faible de 10% de la souche mutante lors de l'entrée en phase stationnaire. Une étude de l'accumulation de cette protéase en cours de croissance a donc été réalisée (voir figure 12.5), afin

d'observer l'évolution des différents profils de la protéase TET au cours de la croissance.

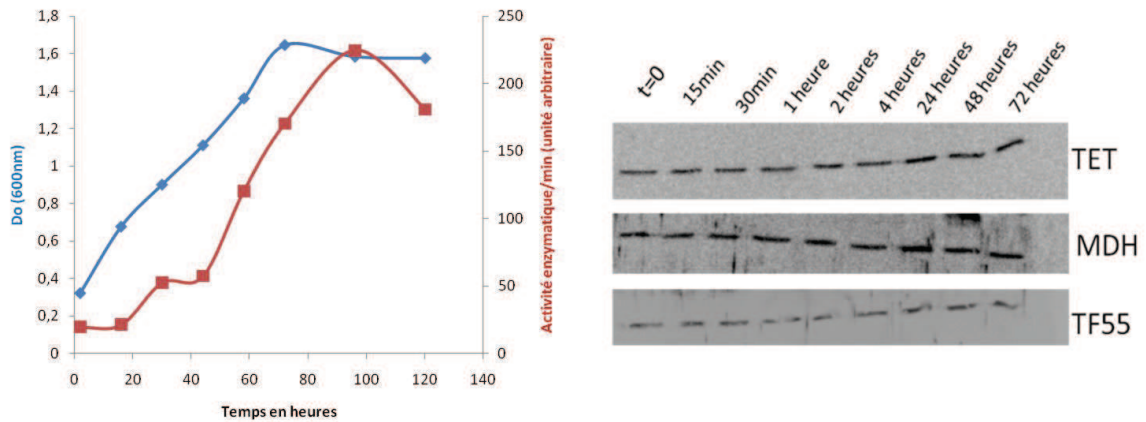
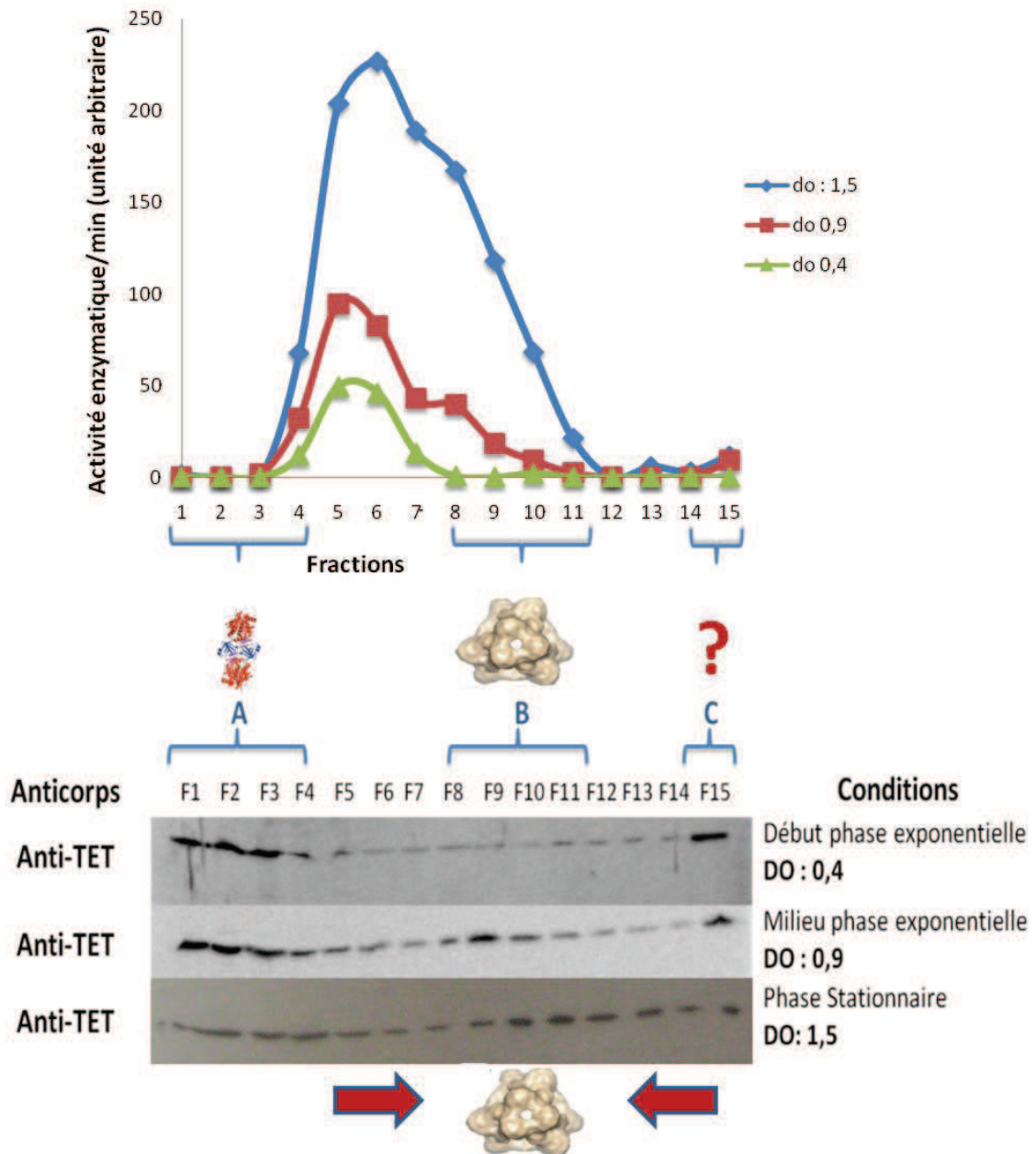


FIGURE 12.5 – **Quantification de l'accumulation de la protéase TET et de l'activité amino-peptidasique totale au cours des différentes phases de la croissance cellulaire chez *H.salinarum*.** **A gauche**, en bleu : courbe retraçant la croissance d'une culture de *H.salinarum* ; en rouge : mesure de l'activité amino-peptidasique totale sur des extraits protéiques, normalisée par rapport à la quantité totale de protéines (par Bradford). **A droite** Immuno-révélation par la technique de Western-blot de la protéase TET et des contrôles MDH(malate déhydrogénase) et TF55 (thermosome) des fractions protéiques normalisées et prélevées au cours des différents temps de la croissance.

Il est possible de voir que l'activité amino-peptidasique augmente au cours de la croissance, atteint son maximum en début de phase stationnaire, puis chute en phase stationnaire prolongée (courbe rouge de la figure 12.5). Il est aussi possible de voir une légère accumulation de la protéase TET lors de l'entrée en phase stationnaire (Western-blot de la figure 12.5).

Pour compléter l'étude nous avons pris les fractions protéiques d'*H.salinarum* au cours des différentes phases de croissance et nous les avons séparés sur gradient de sucrose 5-20%, puis l'activité amino-peptidasique a été mesurée dans chaque fraction et une immunorévalation de la protéase TET par Western-blot a été réalisée (voir résultats figure 12.6).



L'activité aminopeptidasique augmente clairement enfin de croissance cellulaire des

cultures, cette augmentation est homogène dans toutes les fractions du gradient. Ainsi il est possible de voir que l'activité amino-peptidasique se retrouve toujours dans les mêmes fractions (entre la 4 et la 11, avec un pic aux alentours des fractions 5-6). Sur les différentes courbes de croissance en phase "avancée" un léger épaulement apparaît autour de la fraction 8. Du fait de son emplacement, il serait possible de croire que cette activité dans les fractions 8-9 serait due à l'activité de la protéase TET. En visualisant l'immuno-révélation de la protéase TET sur le gradient et en comparant les résultats obtenus des DO de 0.4 et 0.9, il est possible de voir une accumulation de protéases dans les fractions 8 à 11. Mais cela semble n'être qu'une coïncidence. En effet, sur le gradient de la culture à DO 1.5, il est possible de voir que, bien que l'accumulation de la forme supposée à 12ss soit encore supérieure à celle obtenue en fin de phase exponentielle (DO 0.9), la protéase se trouve majoritairement dans les fractions 10-11. Or, dans ces fractions l'activité amino-peptidasique mesurée est proche de 0. Donc ces activités amino-peptidasique mesurées ne correspondent donc pas à l'activité de la protéase TET. Cette co-localisation de l'activité et de la protéase TET dans certaines conditions de croissance ne semble être qu'un artefact de manipulation.

Néanmoins, même si nous ne pouvons observer l'activité de la protéase TET, le fait d'avoir un changement d'oligomérisation de la protéase dans différentes phases de croissance est un élément important, surtout si l'activité de la protéase est dépendante de son état d'oligomérisation. En effet son état d'oligomérisation semble être régulé en fonction de l'état de croissance, avec un fort recrutement dans les fractions de HPM en fin de phase exponentielle. Il est donc fort probable que l'activité de cette protéase joue un rôle important lors de l'entrée en phase stationnaire et donc lors de carences nutritionnelles.

12.1.4 Essai de dosage de l'activité enzymatique de la peptidase TET après d'immuno-précipitation à haut sel

N'arrivant pas à mesurer directement l'activité de la protéase TET dans les fractions protéiques et même après séparation sur gradient de sucrose, une "purification" par immuno-précipitation a été testée sur des cultures en début de phase stationnaire. Le problème pour la mise en place de cette expérience était la salinité, en effet il est nécessaire de trouver des conditions qui permettent de conserver des protéines intactes (il est donc nécessaire d'avoir une forte salinité), mais aussi des conditions où la réaction antigène-anticorps-billes soit favorable (à trop haute concentration saline les anticorps précipitent). Finalement la condition saline optimale pour cette immuno-précipitation à haut sel est de 2M KCl. Par contre même après immuno-précipitation (voir résultat figure 12.7), aucune activité amino-peptidasique n'a été mesurée. Les raisons de ces mesures d'activité "négatives" peuvent être dues à une trop faible concentration de la protéase "active" (en effet une large partie des protéases TET sont sous forme dimérique), à un blocage de l'activité par la présence de la liaison aux anticorps (nous n'avons pu trouver de conditions permettant de séparer l'anticorps de TET) ou encore à une désoligomérisation des formes à 12ss lors de l'expérience.

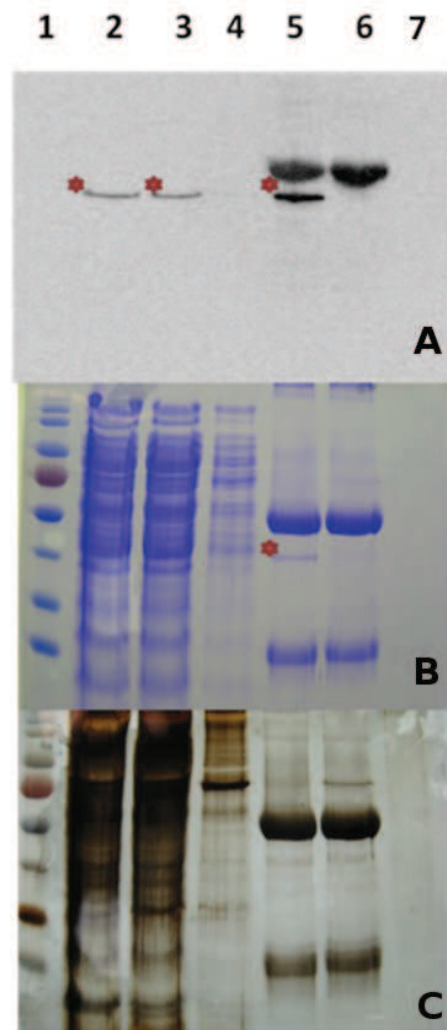


FIGURE 12.7 – Vérification de l'immuno-précipitation de TET *H.salinarum* à haut sel (2M KCl). A. Immuno-révélation par Western-blot de la protéine TET. B. et C. Révélation des protéines par la coloration au Bleu de coomassie et au nitrate d'argent respectivement. Composition des puits : 1 : Marqueur de poids moléculaire ; 2 : Extrait total de *H.salinarum* ; 3 : S30 (surnageant contenant l'extrait protéique débarrassé de l'ADN et des membranes) de *H.salinarum* ; 4 : surnageant après immuno-précipitation TET ; 5 : fractions immuno-précipitées ; 6 : contrôle anti-corps+billes ; 7 : contrôle billes incubé avec S30 sans anticorps.

12.1.5 Disparition de la protéase TET lors de stress

Un rôle possible pour la protéase TET est la dégradation de peptides en aval du protéasome. Le protéasome étant induit lors de stress environnementaux, bien qu'au-

cune différence de croissance n'ait été observée chez le mutant CN5 de *H.volcanii*, il est possible que cette protéase ait un rôle à jouer dans la réponse au stress. Des cultures de *H.salinarum* ont été soumises à un stress hypo-salin à 2,5M ou à un stress thermique à 55°C. Des prélèvements de cellules ont été réalisés au cours du stress et les protéases TET ont ensuite été immuno-révéées par Western-blot, ainsi que la malate déshydrogénase (MDH) servant de contrôle négatif (accumulation peu modifiée au cours du stress) et d'une sous-unité du thermosome (TF55) qui est une protéine chaperonne de réponse au stress thermique (voir résultats figure 12.8).

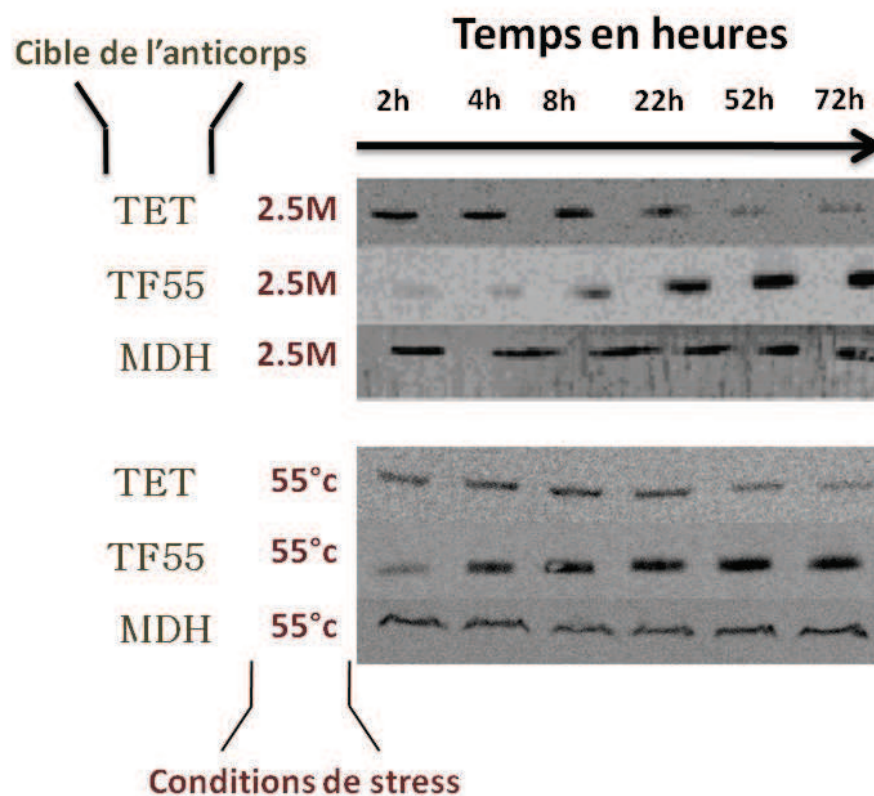


FIGURE 12.8 – Profil d'accumulation de la protéase TET d'*H.salinarum* au cours du temps en présence d'un stress hypo-salin et haute température. Des cultures de *H.salinarum* ont été soumises à un stress hypo-salin modéré (2,5M NaCl extracellulaire) et thermique (55°C), des échantillonnages de chaque culture ont été réalisés au cours du temps, les protéines en ont été extraites et déposées sur gel SDS puis révélées par immuno-détection (Western-blot), les protéines visées sont TET et les contrôles MDH et TF55.

Comme attendu, l'accumulation de la MDH change peu au cours des stress, la protéine TF55 est accumulée rapidement en réponse à un stress thermique (moins de 4 heures après) et un peu plus tardivement pour un stress hypo-salin (environ 8 heures après). Par contre, pour les deux stress il est possible de voir la protéase TET disparaître des fractions protéiques. Cette protéase serait sensible aux stress. Pour confirmer cela, une étude de la vitesse de disparition de cette protéase en fonction de l'intensité du stress a été réalisée (voir résultats figure 12.9).

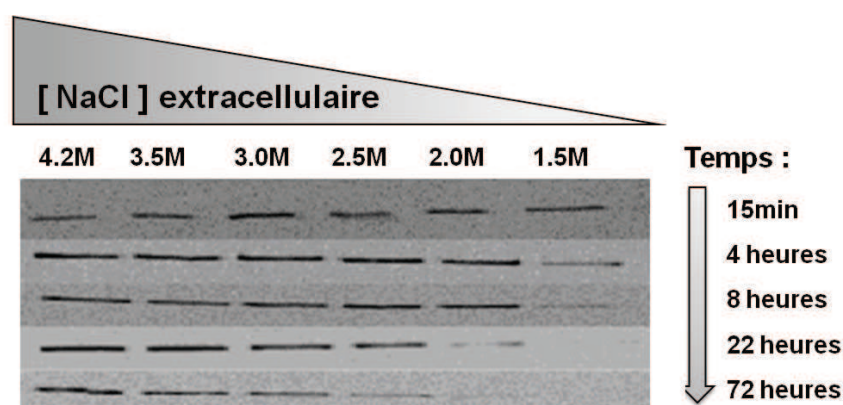


FIGURE 12.9 – Mise en évidence du lien entre l'intensité du stress hypo-salin et la vitesse de disparition de la protéase TET. Immuno-révélation d'extraits protéiques de culture de *H.salinarum* soumis a différentes intensités de stress hypo-salin (3,5 - 3,0 - 2,5 - 2,0 - 1,5M NaCl extracellulaire) au cours du temps. Des contrôles sur la fluctuation de la MDH ont été aussi réalisés mais ne figurent pas sur la figure.

Il est en effet possible de voir que la vitesse de disparition de la protéase TET est dépendante de l'intensité du stress. Plus la condition saline extracellulaire est basse (donc plus le stress est intense) plus la protéase TET disparaît rapidement des fractions cellulaires. Cette sensibilité ne veut pas forcément dire que cette protéase ne joue pas un rôle au cours de ces types de stress. EN effet, bien que l'accumulation de cette protéase soit sensible aux stress, il est possible que se ne soit que la forme dimérique qui disparaissent (et/ou qui n'est pas renouvelée) et que la cellules conserve un "pool" de protéases TET fonctionnelles sous formes actives (particule à 12 sous-unités). Pour vérifier cela, une culture a été divisé en trois, la première partie est cultivée en condi-

tions normales, la seconde subit un stress hypo-salin à 2,5M NaCl extracellulaire et la dernière un stress thermique à 55°C pendant environ 20 heures. Les cultures sont ensuite culottées, les protéines extraites et séparées par gradient de sucrose 5-20% et finalement la protéase TET est révélée dans chaque fraction par immuno-détection (voir résultats figure 12.10).

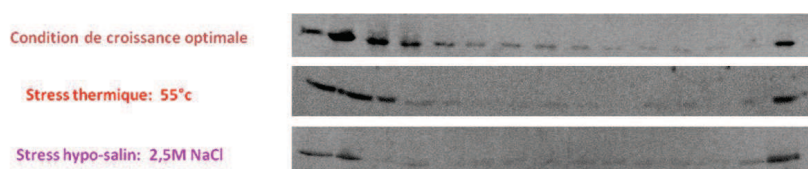


FIGURE 12.10 – **Révélation par immuno-détection des formes de TET présentes lors d'un stress hypo-salin et thermique, après séparation sur gradient de sucrose 5-20%.** Sur la figure en haut, immuno-détection de la protéase TET en conditions de culture normales. Au milieu, en conditions de stress thermique (55°C) pendant 20 heures. En bas, en conditions de stress hypo-salin (2,5M NaCl) pendant 20 heures.

Il est nettement visible, que toutes les formes de TET cytoplasmiques sauf celles présentes dans la fraction 15 semblent être sensibles aux stress et disparaissent pour les deux types de stress.

Il semble donc que cette protéase ne soit donc pas nécessaire lors de la réponse aux stress physiques environnementaux et est même rapidement dégradée lors d'un stress modéré. Cette dégradation peut être due au fait que la protéase ne joue pas un rôle primordial dans ces conditions ou que la stabilité de cette protéase est sensible aux stress et que sa dégradation/disparition est due à sa dénaturation. Mais aussi, il est possible que l'activité (le rôle cellulaire) de cette protéase soit "néfaste" lors de ces types de stress et donc les cellules dégradent rapidement (et en priorité la forme active) la protéase TET, même dans des conditions de stress modéré.

12.1.6 Accumulation et recrutement de la forme 12 sous-unités de la protéase TET au cours de carences nutritionnelles

Lors de l'étude portée sur le mutant CN5 TET de *H.volcanii* en conditions de carences nutritionnelles (fin de phase exponentielle en milieu "Hv-YPC", mais aussi en milieu carencé comme le "Hv-peptone" ou les milieux "Hv-AA"), un phénotype différent de celui de la souche sauvage a été clairement visible. Etant donné l'important recrutement de la forme dodécamérique de la protéase TET de *H.salinarum* en fin de phase exponentielle, il semble possible que ce recrutement de la forme à 12 sous-unités soit effectif dans ces mêmes conditions nutritionnelles chez *H.salinarum*.

Pour visualiser cela, une culture en phase exponentielle a été divisée en quatre, les cellules ont été culottées. La première partie a été re-suspendue dans un milieu de croissance optimal (Hs 4.2M); la deuxième avec un milieu "Hs peptone" (c'est à dire sans extrait de levure); les troisième et quatrième avec un milieu "Hs a.a." avec ou sans source d'énergie (Glycerol, Sodium Succinate). Les cellules sont mises en culture pendant 20 heures à 37°C. Les protéines des cellules après culottage sont ensuite extraites, une partie est directement déposée sur gel SDS-page pour réaliser une immuno-révélation de la protéase TET et ainsi comparer les différences d'accumulation de la protéase entre les différentes conditions nutritionnelles (l'intensité des spots a été mesurée à l'aide du logiciel de capture Kodak et les résultats sont présentés sur la figure 12.11); l'autre partie est utilisée pour réaliser une séparation sur gradient de sucrose et ainsi visualiser les proportions des différentes forme de TET présentes dans le cytoplasme par le biais d'une immuno-révélation par Western-blot (voir résultats figure 12.12).

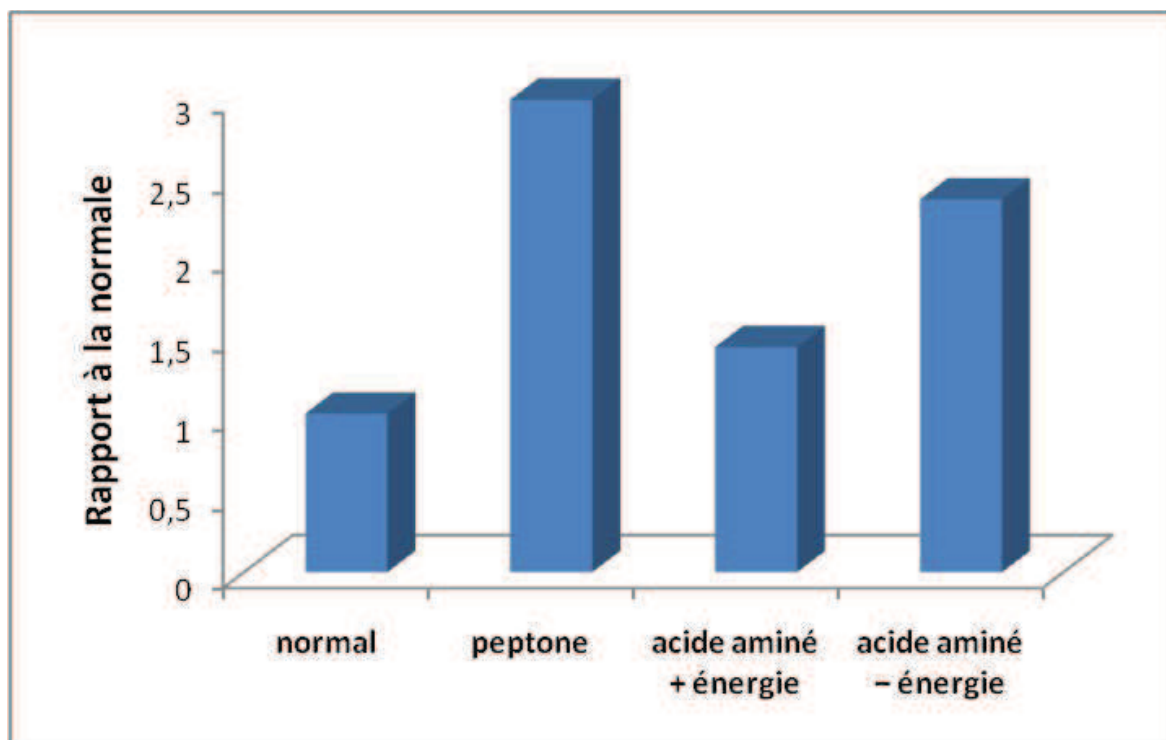


FIGURE 12.11 – **Comparaison de la concentration de la protéase TET accumulée dans le cytoplasme au cours de stress nutritionnels.** L'intensité des bandes obtenues après Western-blot a été mesurée grâce au logiciel de capture Kodak, l'intensité de la bande de l'échantillon contrôle c'est à dire celui cultivé dans des conditions nutritionnelles optimales/normales (milieu Hs 4,2M) a été rapporté à la valeur "1" et sert de référence.

Il est possible de voir une nette accumulation de la protéase TET dès la présence de modifications nutritionnelles, avec un effet plus important lors de la présence de petits peptides (tryptone) qui multiplie la concentration cytoplasmique de la protéase TET par 3. L'accumulation est aussi visible en milieu défini composé d'acides aminés (accumulation x1,5) et est amplifiée lorsque le milieu "Hs a.a." n'apporte plus de source d'énergie (accumulation x2,5).

En visualisant la présence des différentes formes cytoplasmiques de TET lors de la mise sous carence, il est aussi possible de voir un net recrutement de TET dans les fractions HPM lorsque les cellules sont mises en présence uniquement de petits peptides, ce recrutement n'apparaît pas dans les milieux composés uniquement d'acides-aminés.



FIGURE 12.12 – **Immuno-révélation de la protéase TET pour les cultures soumises à un stress nutritionnel.** Les fractions protéiques ont été séparées par gradient de sucrose 5-20% puis révélées par Western-blot.

Les résultats présentés dans les deux figures précédentes ont été regroupés et sont présentés sur la figure 12.13. Cela permet ainsi de comparer l'accumulation des différentes formes cytoplasmiques de TET entre les différents milieux de carences.

Il est ainsi possible de voir une importante augmentation de la protéase TET dodécamérique dans le cytoplasme pour le milieu peptone par rapport à la condition normale/optimale de croissance (la concentration est 7 fois supérieure), que la concentration de la forme dimérique augmente légèrement (x1.5) et que la forme présente dans la fraction 15 augmente de 3 fois. Pour les deux milieux "Hs a.a.", on mesure la même quantité de la forme dodécamérique (environ 2 fois moins concentrée que pour l'échantillon normal) et de la forme présente dans la fraction 15 (environ 4 fois plus concentrée que pour l'échantillon normal). Par contre il est possible d'observer dans ces dernières conditions de croissance, une nette augmentation de la concentration de la forme dimérique, avec une augmentation de 1.5 fois pour un milieu "Hs a.a." et d'environ 4 fois pour un milieu "Hs a.a. sans apport d'énergie".

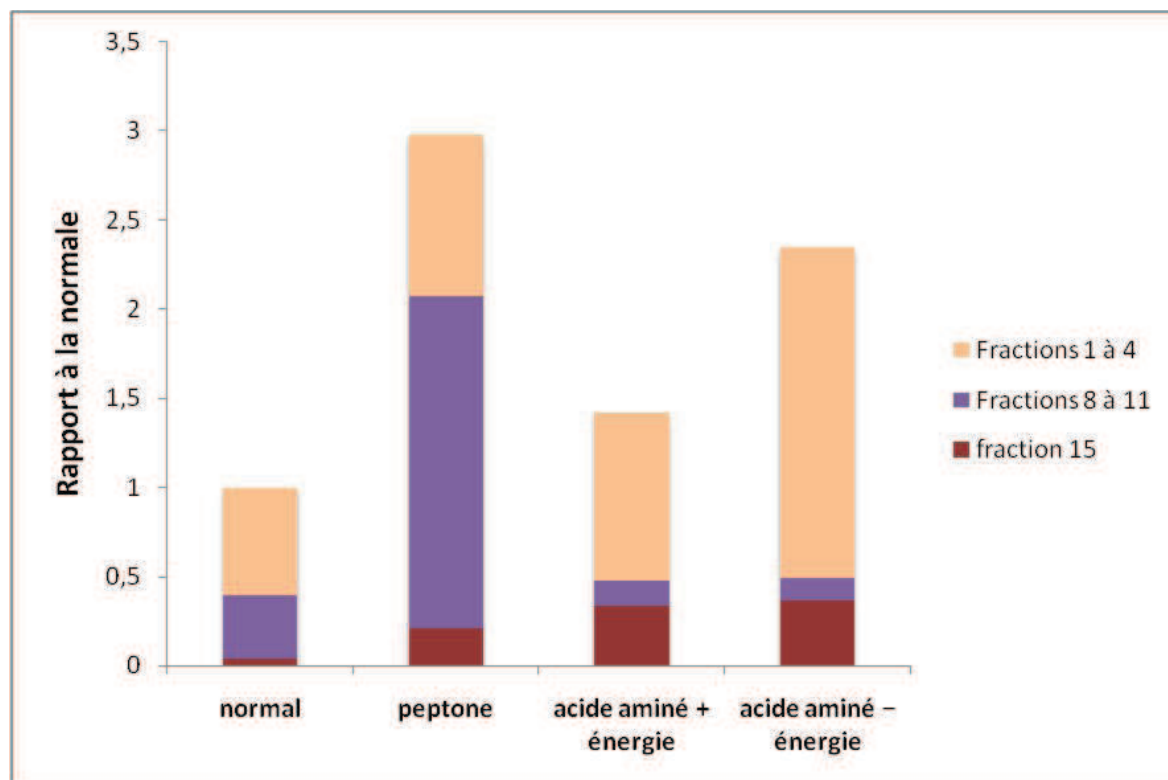


FIGURE 12.13 – **Comparaison de la quantité des différentes formes de TET accumulées lors de stress nutritionnels.** Les valeurs ont été rapportées à la valeur du contrôle "normal". Pour obtenir la hauteur des barres de l'histogramme, une quantification de l'intensité des bandes de Western-bolt a été utilisée sur des échantillons protéiques de chaque culture. Pour obtenir la composition de chaque barre de l'histogramme, une quantification de l'intensité des bandes de chaque fraction des gradients de sucrose immuno-révélés par Western-bolt a été utilisée.

En réponse à un stress nutritionnel, où le milieu de culture n'est composé que de petits peptides comme source de nutriments, la présence de la forme à 12 sous-unités de la protéase TET semble primordiale. En effet cette forme devient non seulement la forme cytoplasmique majoritaire, mais la concentration de cette forme seule équivaut presque à 2 fois la concentration de toutes les formes cytoplasmiques de TET en conditions nutritionnelles normales.

Par contre en milieu défini où l'apport nutritionnel n'est composé que d'acides-aminés, on peut observer une disparition (ou un non recrutement) de la forme à 12 sous-unités au profit des deux autres formes. Malgré cela il semble, du fait de l'augmentation de

l'accumulation totale de la protéase TET par rapport à la condition nutritionnelle normale, que cette protéase joue un rôle dans la réponse à ce type de stress nutritionnel par le biais de sa forme dimérique et de sa forme "inconnue" associées à des complexes de haut poids moléculaire (fraction 15).

Il semble donc que la forme à 12 sous-unités de la protéase TET intervienne pour la prise en charge et/ou la dégradation des peptides extracellulaires, mais n'intervient pas pour la prise en charge des acides aminés extracellulaires et que la forme dimérique n'est pas essentielle pour la prise en charge et/ou la dégradation des peptides extracellulaires, mais semble importante pour la prise en charge des acides aminés extracellulaires.

12.2 Discussion

Il en ressort qu'in vivo la particule dodécamérique ne semble pas être la seule forme présente utile et donc "active". En effet une forme de bas poids moléculaire (surement la particule dimérique) et une forme inconnue de très haut poids moléculaire semblent essentielles pour la prise en charge des acides-aminés comme nutriments pour la cellule. La présence de ces différentes formes cytoplasmiques peut s'expliquer de plusieurs façons qui peuvent se combiner entre elles :

- La cellule génère un pool de particules dimériques de TET non actives (sans activité amino-peptidasique), qui vont aller interagir avec des cibles à dégrader, une fois fixées à la cible, il y a recrutement de la forme dodécamérique pour activer l'activité de protéolyse. Une fois le complexe activé, il le reste d'où l'augmentation de l'accumulation des formes dodécamériques. La cellule essaie de plus de toujours garder un "pool" constant de protéases dimériques.
- Comme précédemment, la cellule génère un pool de particules dimériques de TET non actives en prévision d'un recrutement rapide de protéases dodécamériques actives lorsque cela devient nécessaire, en présence d'un signal de nature inconnu.
- Les différentes formes de la protéase TET présentes dans le cytoplasme sont toutes

actives, la protéase TET joue des rôles et possède des activités peptidasiques différentes en fonction de son état d'oligomérisation.

- La forme dodécamérique est une forme active de la protéase TET, son intervention est nécessaire pour l'utilisation des peptides extracellulaires assez longs (chaîne de plusieurs acides aminés) comme source de nutriments, par l'activation des transporteurs de peptides et/ou par la dégradation des peptides entrant dans la cellule.
- La forme dimérique peut posséder une activité amino-peptidasique propre ou non, cette forme est essentielle pour l'utilisation de nutriments extracellulaires de type acide aminé, par exemple en activant les transporteurs d'acides aminés ou les transporteurs de di-peptides tout en contrôlant les acides aminés entrant et en contrôlant/dégradant les di-peptides entrant pour générer un pool d'acides aminés dans le cytoplasme.

Le fait de ne pouvoir mesurer l'activité amino-peptidasique *in vivo* de cette protéase TET, que ce soit de la forme dimérique ou dodécamérique, ne permet pas de conclure sur le rôle exact de TET.

Une étude récente non publiée sur l'activité amino-peptidasique, réalisée au laboratoire par Alexandre Appolaire sur des mutants de la protéase TET2 de *Pyrococcus horikoshii* permettant de stabiliser *in vitro* la forme dimérique et dodécamérique, montre clairement que la particule dimérique possède une activité amino-peptidasique équivalente à la forme dodécamérique pour des peptides de très petite taille (dipeptide) ; par contre la forme dodécamérique est la forme optimisée pour dégrader des peptides longs (par exemple elle est 2,5 fois plus performante que la forme dimérique pour un peptide composé de 11 résidus).

Il est donc fort probable que tout comme la protéase TET2 d'*H. horikoshii*, la forme dimérique majoritairement présente dans des conditions de croissances normales possède une activité amino-peptidasique permettant de dégrader de petits peptides en acides aminés. Par contre lorsque la dégradation d'un nombre important de peptides plus longs devient nécessaire, un recrutement de la forme dodécamérique s'effectue.

Au vu des résultats obtenus sur les TET de *H.salinarum* et *H.volcanii*, il semble évident que cette protéase ne joue pas juste un rôle en aval du protéasome pour la dégradation de peptides en acides aminés, mais que cette protéase semble essentielle dans le transport/prise en charge/dégradation de nutriments, en particulier pour des nutriments de type petits peptides et d'acides aminés.

En conclusion il semble que cette protéase TET joue plusieurs rôles clés dans la cellule. De plus, bien que son activité amino-peptidasique semble complémentaire avec le complexe protéasome, il semble peu probable que ces protéines soient associées, en effet la protéase TET est dégradée en conditions de stress hypo-salin et thermique, alors que le complexe protéasome est induit. Cette protéase TET pourrait donc appartenir à un système de protéolyse annexe, différent du système protéasome, avec des rôles dans la cellules différents et complémentaires aux rôles du système protéasome. Son implication semble en particulier primordiale lorsque la cellule ne possède que des petits peptides et des acides aminés comme source de nutriments et lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire.

Cinquième partie

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse a permis de confirmer que la diffusion de neutron est un outil permettant de mesurer *in vivo* l'effet d'un stress sur la dynamique des protéines. En effet nous avons pu mettre en évidence, *in vivo*, l'effet d'un stress sur la dynamique moléculaire du protéome d'*Halobacterium salinarum* pour des stress de différentes intensités et de différentes natures (stress thermique et stress hypo-salin). De ce fait cette technique pourrait donc être intéressante pour tester l'action de drogues, de médicaments ou de pathologies sur différents types cellulaires ou organismes.

Du point de vue halophilisme, j'ai montré que dans un contexte intracellulaire, le protéome d'*Halobacterium salinarum* conserve des caractéristiques halophiles marquées. De plus la dynamique moléculaire du protéome halophile est perturbé pour des changements modérés de salinité dans l'environnement (2,5M NaCl extracellulaire). En répondant à la question : " *quelles sont les limites d'adaptation au stress hypo-salin de cet organisme ?*", j'ai découvert l'existence d'un mécanisme qui permet la survie des archées hyper-halophiles à basse salinité par des changements de morphologie et une modification de la composition du protéome. Ainsi en contrôlant l'intensité du stress, l'organisme hyper halophile *H. salinarum* peut survivre à un environnement hypo-salin (jusqu'à 0,5M NaCl extracellulaire). Cette survie s'accompagne de changements morphologiques importants, d'une forme en bâtonnet les cellules prennent à partir de 2,5M NaCl extracellulaire une forme ovoïde. Au cours de ce phénomène de survie, j'ai pu montrer que ces cellules ne conservent pas leur potassium intracellulaire. Etant en présence d'organisme hyper-halophile dont le protéome est adapté à de forte concentration en sel, le fait de ne pas conserver le potassium intracellulaire doit engendrer des contraintes énormes pour le protéome car celui-ci est sel dépendant. Ainsi nous avons pu observer des changements importants de la composition du protéome avec une accumulation de protéines spécifiques et la disparition de la majorité des protéines cytoplasmiques.

En perspective, il serait intéressant d'identifier ces protéines présentes à basse salinité. Puis de les caractériser fonctionnellement et structuralement. Mais aussi d'étudier les

modifications du protéome et du transcriptome lors de la survie au stress. Enfin une analyse de l'accumulation des solutés compatibles pouvant jouer un rôle osmoprotectant lors de ce phénomène pourrait être déterminante pour comprendre les mécanismes mis en place lors de la survie à basse salinité.

Du point de vue protéolyse intracellulaire, mon travail de thèse a permis d'orienter la recherche du rôle de l'aminopeptidase TET, *in vivo*, plutôt vers une voie métabolique alors qu'on lui prédisait uniquement un rôle de partenaire du protéasome. J'ai pu montrer que cette protéine était sensible/régulée en condition de stress physique (basse salinité ou température) et que son état d'oligomérisation était contrôlé par les conditions nutritionnelles et de phase de croissance. Enfin, d'après l'étude réalisée, il en ressort une possibilité d'avoir des rôles différents pour chaque type d'association de TET.

En perspective, il serait intéressant de réaliser une étude *in cellulo* de la protéase TET, en se focalisant sur la localisation (par imagerie), l'association (compartimentation cellulaire) et les partenaires (*pull down* , co-immuno-précipitation) des différentes formes de cette protéase.

De plus, une étude génétique plus poussée pourrait permettre de mieux définir le phénotype d'organisme privé de la protéase TET, soit en réalisant un double mutant TET chez *H.volcanii*, soit en réalisant un simple mutant chez *H.salinarum*.

Sixième partie

Matériels et méthodes

Chapitre 13

Croissance et manipulation du matériel vivant utilisé

13.1 Milieux de culture

13.1.1 Milieu et conditions de croissance optimum d'*Halobacterium salinarum*

- Milieu Hs 4.2M

L'organisme *Halobacterium salinarum* R1 est cultivé à 37°C, dans un milieu hypersalin standard à 4,2M de NaCl et sous agitation modérée pour une culture en milieu liquide (110 rpm (rotations par minute)).

Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Milieu Hs 4.2M"), dissoudre dans 500ml d'H₂O distillée : 250g NaCl , 20g MgSO₄, 3g extrait de levure, 5g tryptone, 3g KCl, 3g Trisodium Citrate. Puis compléter à 1L qsp avec H₂O distillée. Autoclaver. Ajuster à pH=7,5 avec du NaOH concentré.

Pour composer 1 litre de milieu de culture solide (nommé "Milieu Hs 4.2M solide"), dissoudre 14g d'agar dans 1 litre de "Milieu Hs 4.2M".

Autoclaver.

13.1.2 Milieu et conditions de croissance optimum d'*Haloferax volcanii*

- Milieu Hv-YPC

L'organisme *Haloferax volcanii* est cultivé à 45°C, dans un milieu hyper-salin à 2,4M de NaCl et sous agitation à 130 rpm.

Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Hv-YPC") dissoudre dans 500ml d'eau chaude : 144g NaCl, 18g MgCl₂.6H₂O, 22g MGSO₄.7H₂O, 4g KCl, 12ml Tris-HCl 1M pH=7,5. Dissoudre, à part, dans 20ml d'eau : 1g peptone (marque Oxoid), 5,2g extrait de levure, 1g Casamino acide et rajouter 2ml KOH 1M. Mélanger les deux solutions et compléter à 1 litre avec H₂O distillée. Autoclaver. Laisser refroidir et ajouter 3ml CaCl₂ 1M stérile.

Pour composer 1 litre de milieu culture solide (nommé "Hv-YPC solide"), dissoudre 14g d'agar dans 1 litre de "Milieu Hv-YPC".

Autoclaver.

13.1.3 Milieux de croissance pour stress nutritionnels d'*Halobacterium salinarum*

- Milieu Hs peptone

Dans ce milieu la source de nutriment "extrait de levure" est supprimée et est remplacée par un apport supérieur en "tryptone".

Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Milieu Hs tryptone"), dissoudre dans 500ml d'H₂O distillée : 250g NaCl, 20g MgSO₄, 8g tryptone, 3g KCl, 3g Trisodium Citrate. Puis compléter à 1L qsp avec H₂O distillée.

Autoclaver. Ajuster à pH=7,5 avec du NaOH concentré.

- Milieu Hs levure

Dans ce milieu la source de nutriment "tryptone" est supprimée et est remplacée par un apport supérieur en "extrait de levure".

Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Milieu Hs levure"), dissoudre dans 500ml d'H₂O distillée : 250g NaCl, 20g MgSO₄, 8g extrait de levure, 3g KCl, 3g Trisodium Citrate. Puis compléter à 1L qsp avec H₂O distillée.

Autoclaver. Ajuster à pH=7,5 avec du NaOH concentré.

- **Milieu Hs a.a.**

Ce milieu est un milieu minimum dont la source en nutriments est composée d'acides aminés. Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Milieu Hs a.a."), dissoudre dans 500ml d'H₂O distillée : 250g NaCl, 20g MgSO₄, 2g KCl, 0.2g KNO₃, 0.3g CaCl₂.2H₂O, 0.15g KH₂PO₄, 0.15g K₂HPO₄, 0.5g Sodium citrate.2H₂O, 0.005mg CuSO₄.5H₂O, 2.3mg FeCl₂.4H₂O, 0.44mg ZnSO₄.7H₂O, 1.0g Glycerol et les acides aminés suivants : 0.43g L-alanine, 0.40g L-arginine, 0.05g L-cysteine hydrochloride monohydrate, 1.3g L-glutamic acid, 0.06g glycine, 0.44g L-isoleucine, 0.8g L-leucine, 0.85g L-lysine, 0.37g L-methionine, 0.26g L-phenylalanine, 0.5g L-proline, 0.6g L-sérine, 0.5g L-thréonine, 0.2g L-tyrosine, 1.0g L-valine.

Autoclaver. Ajuster à pH=7,5.

13.1.4 Milieux de croissance pour stress nutritionnels d'*Haloferax volcanii*

- **Milieu HV-YPC peptone**

Dans ce milieu la source de nutriment "extrait de levure" est supprimée et est remplacée par un apport supérieur en "peptone".

Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Hv-YPC peptone") dissoudre dans 500ml eau chaude : 144g NaCl, 18g MgCl₂.6H₂O, 22g MgSO₄.7H₂O, 4g KCl, 12ml Tris-HCl 1M pH=7,5. Dissoudre à part dans 20ml d'eau : 7g peptone

(marque Oxoid) et rajouter 2ml KOH 1M. Mélanger les deux solutions et compléter à 1 litre avec H₂O distillée. Autoclaver. Laisser refroidir et ajouter 3ml CaCl₂ 1M stérile. Pour composer 1 litre de milieu culture solide (nommé "Hv-YPC solide"), dissoudre 14g d'agar dans 1 litre de "Milieu Hv-YPC".

Autoclaver.

• Milieu HV-levure

Dans ce milieu la source de nutriment "peptone" est supprimée et est remplacée par un apport supérieur en "extrait de levure".

Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Hv-YPC levure") dissoudre dans 500ml eau chaude : 144g NaCl, 18g MgCl₂.6H₂O, 22g MgSO₄.7H₂O, 4g KCl, 12ml Tris-HCl 1M pH=7,5. Dissoudre à part dans 20ml d'eau : 7g d'extrait de levure et rajouter 2ml KOH 1M. Mélanger les deux solutions et compléter à 1 litre avec H₂O distillée. Autoclaver. Laisser refroidir et ajouter 3ml CaCl₂ 1M stérile.

Pour composer 1 litre de milieu culture solide (nommé "Hv-YPC solide"), dissoudre 14g d'agar dans 1 litre de "Milieu Hv-YPC".

Autoclaver.

• Milieu HV-AA

Ce milieu est un milieu minimum pour *H.volcanii* dont la source en nutriments est composée d'acides aminés.

Pour composer 1 litre de milieu de culture liquide (nommé "Milieu Hv-YPC a.a."), dissoudre dans 500ml d'H₂O distillée : 144g NaCl, 18g MgCl₂.6H₂O, 22g MgSO₄, 4g KCl, 0.2g KNO₃, 0.3g CaCl₂.2H₂O, 0.3g NH₄Cl, 0.15g KH₂PO₄, 0.15g K₂HPO₄, 0.005mg CuSO₄.5H₂O, 2.3mg FeCl₂.4H₂O, 0.44mg ZnSO₄.7H₂O, 0.36mg MnCl₂, 2.0g Glycerol, 2.0g (2mL) Sodium Succinate (acide succinique) et les acides aminés : 0.43g L-alanine, 0.40g L-arginine, 0.05g L-cysteine hydrochloride monohydrate, 1.3g L-glutamic acid, 0.06g glycine, 0.44g L-isoleucine, 0.8g L-leucine, 0.85g L-lysine, 0.37g L-methionine, 0.26g L-phenylalanine, 0.5g L-proline, 0.6g L-sérine, 0.5g L-thréonine, 0.2g L-tyrosine,

1.0g L-valine, 12ml Tris-HCl 1M pH=7,5.

Autoclaver. Ajuster à pH=7,5.

Il est possible de compléter ce milieu avec les acides aminés manquant (milieu nommé "Milieu Hv-YPC a.a. complétement") : 0.4g Acide aspartique, 0.45g Acide glutamique, 0.25g Histidine, 0.4g Asparagine, 0.3g Tryptophane.

13.1.5 Milieux pour le stress bas sel d'*Halobacterium salinarum*

Les milieux utilisés pour diluer et soumettre un stress bas sel aux cultures est identique au milieu optimum dans sa conception, le seul élément changeant est la quantité de NaCl. Exemple pour le milieu optimum : 250g/L, pour le milieu OM.

13.2 Suivi de la croissance

Dans les conditions optimum, ces organismes ont un temps de génération long et non linéaire (en moyenne la DO à 600nm (voir chapitre suivant) augmente de 0.3 toutes les 24h). La croissance cellulaire est suivie par des mesures de l'absorbance à 600nm, par comptage de colonies sur boîte, par comptage de cellules en microscopie et par dosage des protéines totales par la méthode de Bradford (voir chapitre 14.3 pour cette technique).

13.2.1 Densité optique

La mesure de la turbidité ou densité optique (DO) se fait grâce à un spectrophotomètre. La DO désigne le logarithme décimal de l'opacité, c'est-à-dire l'inverse de la transmission (transparence) à une longueur d'onde définie. La longueur d'onde utilisée pour mesurer la quantité de cellules est de $\lambda = 600nm$.

Le nombre de cellules présentes en solution dans des conditions normales est proportionnelle à l'opacité de la solution (dans une gamme de DO allant de 0.2 à 1.2). Pour chaque incrémentation de DO de 0.1 à partir de DO=0.2, il y a environ 10^8 cellules/mL en plus, soit pour DO=0.2, il y a 2×10^8 cellules/mL, pour DO=0.8, il y a 8×10^8 cellules/mL et pour une DO=1.2, il y a 1.2×10^9 cellules/mL.

Cette technique est une technique de routine en laboratoire pour suivre la croissance des cultures, par contre cette technique n'est pas totalement fiable lors du suivi de cultures en stress, car le stress peut générer de grande quantité de débris (dus à des dégradations ou une forte mortalité) qui vont être "détectés", tout comme les cellules intactes, par la mesure de la DO. Il se peut même que la DO augmente plus vite lors de la lyse des cellules.

13.2.2 Comptage sur boîte

Le comptage de colonies sur boîte est une technique de dénombrement mais aussi de viabilité des cellules procaryotes. Le principe est d'étaler une culture sur un milieu de culture solidifié (pour la composition de ces milieux de culture voir chapitre 13.1.1) et de laisser pousser les cellules dans une étuve (pour nos cellules à 37°C), pour que chaque cellule forme une colonie visible à l'œil nu. Il faut diluer l'échantillon à mesurer de telle sorte qu'il y ait entre 5 et 50 cellules par boîte.

Le problème de cette technique pour notre sujet d'étude (qui a un temps de dédoublement peu rapide) est que cette mesure n'est pas directe : il faut environ 2 à 3 semaines pour des cultures non stressées pour avoir les premiers résultats.

De plus cette technique n'est pas fiable pour des cultures subissant un stress bas sel, car le fait de les étaler sur un milieu riche en sel va provoquer un autre choc osmotique souvent létal.

La combinaison du comptage par microscopie et de la mesure de la viabilité par la technique Life/Dead est une méthode de choix pour contourner ce problème de temps

et de "sur-stress".

13.2.3 Comptage par microscopie

On compte les cellules par dépôt de $10\ \mu\text{L}$ de culture diluée au 1/10 sur une lame de cellules à numération Neubauer, avec un microscope par contraste de phase Olympus BX61-UCB couplé à une caméra CCD Retiga-SRV équipée d'un objectif UPFLN x100. La lame Neubauer a en son centre une grille de numération composée d'un quadrillage carré visible uniquement au microscope (voir figure 13.1).

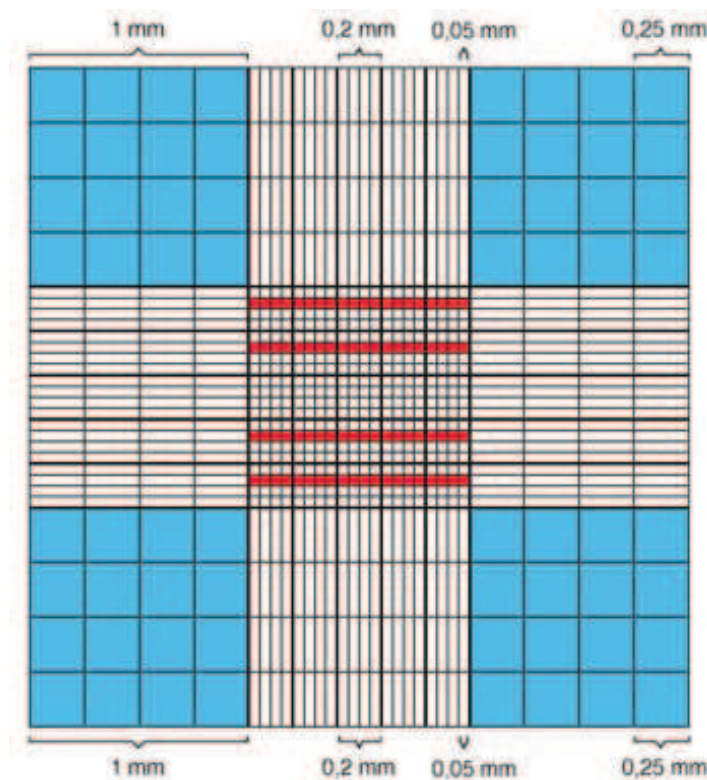


FIGURE 13.1 – **Représentation schématique d'une lame de numération Neubauer** : en rouge exemple de zone de comptage

On compte en moyenne les cellules présentes sur 4 lignes de 20 carrés. Les cellules sont comptées selon la règle en L, qui consiste à considérer les éléments qui se trouvent

à l'intérieur des carrés, ainsi que ceux qui sont en contact avec la ligne de gauche délimitant le premier carré et toute la ligne inférieure. Chaque petit carré a une aire de $0,0025 \text{ mm}^2$ et l'épaisseur entre la lame et la lamelle est de 0.1 mm .

Pour remonter au nombre de cellules il faut utiliser la formule suivante :

$$\text{Nombre de cellules finales} = \frac{(\text{nombre de cellules comptées} * \text{facteur de dilution} * \text{facteur de conversion})}{(\text{nombre de carrés} * \text{volume d'un carré})}$$

- Le facteur de dilution correspond à la dilution effectuée avant le dépôt (pour nous $1/10$).
- Le facteur de conversion correspond à l'unité voulue pour exprimer le nombre de cellules finales ($\times 1$ pour exprimer en μL , $\times 10^3$ pour exprimer en mL et $\times 10^6$ pour exprimer en litres).
- Le nombre de carrés correspond au nombre de carrés de $0,0025 \text{ mm}^2$ utilisés pour compter les cellules.
- Le volume d'un carré = 0.00025 mm^3 .

13.2.4 Mesure de la viabilité (technique Live/Dead)

La viabilité des cellules est analysée grâce au kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability pour microscopie (L7012, Invitrogen) et grâce au microscope par contraste de phase Olympus BX61-UCB.

$100 \mu\text{L}$ de culture (plus ou moins diluée) est incubé à l'abri de la lumière pendant 15 min avec $5 \mu\text{L}$ du mélange d'iodure de propidium (1.2 mM) et de SYTO 9 (0.2 mM).

$15 \mu\text{L}$ de la culture est déposé sur lame pour microscopie. On utilise une lampe à fluorescence X-Cite 120 (EXFO) couplée au microscope, avec les filtres CY3 et DAPI, pour observer le marquage au SYTO9 et à l'iodure de propidium respectivement. Le traitement des images est réalisé grâce au logiciel Volocity 5

Ces deux composés sont des intercalants fluorescents d'acides nucléiques. Le SYTO9 est un composé qui passe facilement la barrière formée par la membrane de la cellule. Ce composé va donc s'insérer dans tous les "morceaux" d'ADN présents dans la culture, donc dans les cellules vivantes, mais aussi dans les cellules mortes. Avec le filtre utilisé (DAPI) les cellules apparaissent colorées en vert fluo du fait de la présence de ce composé.

L'iodure de propidium n'est pas "capable" de traverser une membrane cellulaire intacte, il va donc s'insérer que dans les cellules mortes, où la membrane est désorganisée. Avec le filtre CY3 les cellules mortes apparaissent colorées en rouge.

En superposant les cellules rouges aux vertes, il est possible de déterminer un pourcentage de viabilité.

13.3 Stress physiques

13.3.1 Stress bas salinité

- **Pour un stress direct**

Les cellules sont diluées de 4.2M NaCl à la concentration finale en NaCl extracellulaire voulue en une seule étape avec du milieu de culture à 0M (13.1.5).

- **Pour un stress par étape**

Les cellules sont diluées de 4.2M NaCl à la concentration finale en NaCl extracellulaire voulue en intervalles réguliers avec du milieu de culture à 0M en laissant un temps de repos à 37°C et sous agitation entre chaque étape de dilution. Par exemple, pour le stress par étape en 1 heure, il y a 12 étapes de dilution de 5 minutes.

- **Pour un stress progressif**

Les cellules sont diluées de 4.2M NaCl à 1.5M NaCl, pour cela on dilue avec un volume 2,8 fois supérieur au volume initial avec un milieu de culture à une concentration de 0M NaCl. Cette dilution est réalisée progressivement grâce à une pompe péristaltique (voir 9.2). La culture reste pendant toute la dilution à 37°C et sous agitation. Le volume de culture obtenue est alors centrifugé à 2500 rpm pendant 1h et repris dans un volume du même milieu de culture 1.5M NaCl de façon à obtenir la même valeur initiale de densité optique à 600 nm. Puis les cellules sont à nouveau diluées de

la même façon, de 1.5M NaCl à 0.5M NaCl, par ajout de 3 volumes au volume initial d'un milieu de culture à 0M NaCl.

13.3.2 Stress haute température

Pour appliquer un stress thermique, nous plaçons nos cultures sous agitation dans un incubateur réglé à la température voulue pendant 1 à 2 heures. Le temps d'application du stress est dépendant du volume de la culture, plus le volume sera important, plus le temps pour que toute la culture arrive à la température voulue est grand.

Chapitre 14

Biochimie des protéines

14.1 Extractions et échantillonnage

Ce protocole est utilisé pour extraire des protéines halophiles intactes et fonctionnelles. 300 mL de culture est centrifugée à 4500 rpm (45 min, 4°C). Les cellules sont lysées en deux étapes : on provoque un choc osmotique doux par re-suspension dans 1mL de tampon de lyse A (3,2 M KCl, 60mM MgOAc, 50mM Tris-HCl, pH 7,6). Ce tampon de lyse "haut sel" permet de conserver les membranes cellulaires intactes et empêche la dénaturation des protéines halophiles. La solution est homogénéisée avec l'utilisation d'un Potter (si le culot est petit on utilise une seringue de 1mL et une aiguille stérile (0.6mm de diamètre) pour homogénéiser). Puis les cellules sont soniquées 6 fois pendant dix secondes, entre chaque étape on incube le lysat dans la glace durant 1 minute. Ce lysat cellulaire est ensuite traité avec 20U de DNase 1 (Ambion) pendant 30 minutes à température ambiante, afin de dégrader les acides nucléiques. Après centrifugation à 13 000 rpm (45 minutes, 4°C), le surnageant (nommé S30) est prélevé. Il contient les protéines cytosoliques totales. Le culot (nommé C30) contient les membranes et les protéines associées aux membranes.

Remarque : s'il n'y a pas la nécessité de grader des protéines intactes, il est possible de provoquer une lyse par choc osmotique intense en rajoutant seulement au culot un fort volume d'eau distillée et de re-suspendre ce culot avec la technique de la seringue.

Cette solution évite l'étape de la précipitation en TCA nécessaire pour enlever le sel.

14.2 Précipitation à l'acide trichloracétique (TCA)

La séparation par gel SDS-Page et donc l'analyse par immuno-détection nécessite un échantillon avec une concentration en sel faible. Pour extraire les protéines d'un milieu tampon riche en sel, la précipitation au TCA est une technique rapide et efficace. Pour 100 μL d'échantillon, ajouter 1 mL de TCA 15 %, vortexer. Centrifuger 15 minutes à température ambiante avec une centrifugeuse de paillasse réglée à 13200 rpm. Jeter le surnageant et reprendre le culot avec 1 mL d'acétone glaciale (stockée à -20°C). Centrifuger 10 min à 13200 rpm. Enlever le surnageant et laisser le culot sécher à l'air. Reprendre le culot avec du tampon Tris 20mM.

Remarque : pour utiliser l'échantillon directement pour un SDS-Page, il suffit d'ajouter à la dernière étape un volume équivalent à celui du tampon Tris 20mM de Sample Buffer (SB : 50mM Tris, 8M Urée, 2M Thiourée, 3 % SDS, 0.05 % bleu de Bromophénol, 75mM DTT).

14.3 Dosage

A partir des cultures, 500 μL est prélevé et transféré dans des Eppendorf 1.5mL et centrifugé à 13000 r.p.m. pendant 5 minutes. Les culots sont re-suspendu dans 1mL d' H_2O à l'aide d'une seringue 0.6mm (lyse cellulaire). Puis 100 μL de cette solution est mélangée avec 700 μL d' H_2O et 200 μL de réactif de Bradford 5x. Après 5 min et la D.O. est prise à 595nm. Une courbe étalon est réalisée en suivant le même protocole. La solution protéique est remplacée par des solutions de BSA (Bovine Serum Albumine) de concentrations connues : de 0.001à 1.0 mg.mL⁻¹.

14.4 Séparation

14.4.1 Séparation par électrophorèse et détection des protéines (Coomassie, Argent, Western-Blot)

- **Séparation par SDS-PAGE**

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur masse apparente.

Pour l'analyse sur gel SDS-PAGE, les culots des cellules sont repris dans 400 μ L d' H_2O , puis 400 μ L de tampon de dépôt SB (50mM Tris, 8M Urée, 2M Thiourée, 3 % SDS, 0.05 % bleu de Bromophénol, 75mM DTT). On dépose une quantité égale de protéines dans tous les puits (environ 15 μ g).

Les échantillons dans le tampon de dépôt sont chauffés 5min à 95 °C puis centrifugés quelques secondes.

Les échantillons protéiques à séparer sont déposés sur un gel de poly-acrylamide 12 % Sodium Dodécyl Sulfate dénaturant. De plus, on dépose un marqueur de poids moléculaire afin de faciliter l'identification des protéines recherchées (5 μ L de Page-Ruler Prestained Protein Ladder SM0671 (Fermentas)). Ce gel est constitué en deux parties : un gel de concentration (acrylamide/ bis-acrylamide 5 %, Tris 125 mM, SDS 0,1 %, glycérol pH 6,8) permet de concentrer les protéines sur un même front de migration afin qu'elles débutent leur séparation en même temps. Puis la séparation des protéines a lieu sur un gel de séparation (acrylamide/ bis-acrylamide 12%, Tris 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, glycérol 6%). La migration des protéines se fait dans le tampon de migration (25mM Tris, 250mM glycine, 0.1% SDS) à 15mA-300V, jusqu'à ce que le front de migration représenté par le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel. Pour visualiser globalement les protéines, le gel est soit coloré par coloration au bleu de Coomassie, soit par coloration au nitrate d'argent. Pour la visualisation spécifique d'une seule protéine, la technique d'immunodetection par Western-Blot est utilisée.

- **Coloration au bleu de Coomassie**

La coloration au bleu de Coomassie est réalisée à l'aide d'une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie R250 (0,15% de Bleu de Coomassie, 46% H₂O , 45% Ethanol pur, 9% acide acétique) par incubation du gel pendant au moins 15 min sous agitation constante puis par décoloration (7,5% d'acide acétique glacial, 5% d'éthanol, 87,5% H₂O).

- **Coloration à l'argent**

La coloration au Coomassie a un seuil de sensibilité située aux alentours de 0.1 μ g de protéines par dépôt. Lorsque la concentration est inférieure, on doit utiliser une coloration plus performante. L'argent permet une sensibilité 3 fois plus importante. Tout d'abord le gel est complètement décoloré dans 50% méthanol, 10% acide acétique pendant quelques heures. Ensuite on plonge le gel dans une solution avec du dichromate de potassium (3.4mM de potassium dichromate, 1/5000ème d'acide nitrique, H₂O), pendant 5 min. Cette solution va mettre le gel en conditions oxydatives et va ainsi permettre au nitrate d'argent de se fixer. On nettoie le gel à l'eau 4 fois pendant 30s pour enlever l'excès de réactif puis on met notre solution de nitrate d'argent (12mM nitrate d'argent, H₂O) pendant 30 min. On place ensuite le gel dans 150 ml de carbonate de sodium (283mM), formaldéhyde (1/5000ème) et H₂O pendant 2 min, ceci afin d'éliminer l'excès d'argent. Puis on ajoute 250ml de cette même solution. Pendant environ 10 min on agite. Cette solution va réduire l'argent Ag⁺ en Ag[°]. L'Ag[°] devient noir et "solide" et marque plus fortement les protéines. Une fois l'intensité de coloration voulue obtenue, on place le gel dans une solution d'acide acétique (5%), glycérol (5%) et H₂O arrêter la réduction de l'argent. La conservation du gel se fait à l'abri de la lumière.

- **Immunodétection par Western blot**

Cette technique permet d'identifier les protéines par immunomarquage spécifique avec un anticorps.

Après l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les protéines sont "électro-transférées"

sur une membrane hydrophobe de Fluorure de polyvinylidène (Amersham Hybond-P, préalablement perméabilisée avec du méthanol 100%, rincée dans de l'eau et équilibrée dans le tampon de transfert (25 mM Tris pH8.3, 150mM Glycine, 20% méthanol)). Après transfert sous l'action d'un champ électrique de 30mA-300V pendant 1h (appareil à transfert liquide Amersham), les sites aspécifiques de la membrane sont saturés par les protéines du lait (solution de TBS-Tween20 (20mMTris pH 7,6; 150mM NaCl; Tween20 0,05%) complémentée à 5% en lait écrémé) pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite lavée trois fois toutes les 10 minutes avec la solution de TBS-Tween20. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine d'intérêt (diluée au 1/10 000ème dans le tampon TBS-Tween) pendant une heure. La membrane est ensuite lavée trois fois (comme précédemment) puis incubée pendant 30 minutes avec l'anticorps secondaire spécifique anti lapin (diluée au 1/5000ème dans du TBS-tween20). Cet anticorps est de plus couplé à la peroxydase. Une nouvelle étape de lavage est ensuite nécessaire avant de révéler la membrane grâce au kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham). Le kit ECL contient du peracide qui va oxyder la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire qui à son tour va oxyder le luminol présent dans le kit. Un signal chimoluminescent est alors émis par le luminol, détectée grâce à une caméra Kodak 4000MM (ou sur film photographique). Les protéines ciblées vont apparaître sous forme de bandes lumineuses.

Différents anticorps dirigés contre des protéines issues de *H.salinarium* ont été utilisés. L'anticorps anti-Malate déshydrogénase, qui est dirigé contre la protéine entière. L'anticorps anti-TF55 qui est dirigé contre un peptide immunogène interne à la séquence. Les anticorps anti-TET qui sont dirigés, soit contre deux peptides internes à la séquence (nommé antiTET2x, utilisé pour les Westerns-Blot), soit contre les 14 premiers résidus, exposés en surface dans la forme native de la protéine (nommé antiTETnter, utilisé pour les immunoprécipitations).

14.4.2 Séparation par gradient de sucrose

On dépose 500 μL du surnageant protéique (nommé : S30) au sommet d'un gradient linéaire de sucrose 5-20% de 10mL réalisé dans du tampon A à l'aide d'un dispositif à deux compartiments couplé à une pompe péristaltique. Après 20h d'ultracentrifugation à 160 000g et 10°C dans un rotor Beckman SW41, on fractionne le gradient en 15 fractions de 700 μL . Le culot est re-suspendu avec la dernière fraction. Ces conditions ont été déterminées au laboratoire pour permettre une résolution optimale de complexes de protéines halophiles de tailles comprises entre 100kDa et 1MDa (Franzetti 2008). Ces fractions peuvent être utilisées pour des tests d'activité enzymatique ou pour une séparation et analyse par gel SDS-PAGE ou Western-Blot).

14.4.3 Immuno-précipitation à haut sel de la protéase TET

La technique d'immunoprécipitation de TET a été mise au point dans le cadre de cette thèse. Elle peut être appliquée sur des extraits totaux de protéines halophiles et sur les fractions de gradients de sucrose.

L'échantillon est dilué pour avoir une concentration finale en sel de 2,5M KCl dans un tampon Tris-HCl 50mM pH 7,6 ; 60mM MgOAc (tampon A). On ajoute 1/10ème de volume de sérum ou d'anticorps anti-peptide N-ter préalablement purifié par chromatographie d'affinité. Après une heure sous agitation on ajoute 1/10ème du volume de suspension de billes de protéine G-Sépharose (Amersham). Après une nuit d'incubation sous agitation à 4°C, on effectue 2 lavages avec du tampon A. Pour culotter les billes, on utilise une centrifugeuse de paillasse à 2000rpm pendant 10 min.

Pour analyser la qualité et la spécificité de la précipitation, une partie des culots est re-suspendue dans du tampon de dépôt SDS-PAGE. Les protéines immunoprécipitées sont séparées sur gel 12% et révélées par coloration au bleu de Coomassie, au nitrate d'argent ou par immunodétection après transfert sur membrane.

Afin de tenter de stabiliser les interactions entre TET et ses partenaires pour réaliser des co-immunoprécipitations, deux types d'agents pontant ont été testés, le glutaraldéhyde et le DTSSP, ajoutés directement au mélange réactionnel à une concentration finale 0.1%. Le glutaraldéhyde crée des liaisons covalentes stables, le DTSSP crée des ponts disulfures qui peuvent être détruits par le DTT du tampon de dépôt SDS-PAGE. Après une heure d'incubation, l'excès de DTSSP ou de glutaraldéhyde est ensuite éliminé par ultracentrifugation de l'extrait cellulaire sur un coussin de sucrose 10% dans du tampon A (une heure, 100 000g, 10°C dans un rotor Beckman TL100 A). Le culot est repris dans du tampon A et on effectue l'immunoprécipitation comme décrit précédemment.

14.5 Mesure de l'activité amino-peptidasique

Les substrats pour visualiser une activité amino-peptidasique sont des acides aminés couplés soit à la PNA (paranitroaniline) qui est un substrat chromogène, soit à l'AMC (7-amino-4-méthylcoumarine) qui est un substrat fluorogène.

L'absorbance de la libération du substrat PNA lors de l'activité enzymatique est observée à 405 nm par un spectrophotomètre.

L'AMC émet de la fluorescence (excitation à 330nm) s'il est libéré, c'est-à-dire si le substrat est hydrolysé par une amino-peptidase. Cette fluorescence est alors mesurée à 465 nm grâce à un spectrofluorimètre (lecteur de plaque Fluostar Optima), à 40°C et pendant 200 cycles (1min/cycle).

Pour tester l'activité amino-peptidasique dans les gradients de sucrose, 115 μ L de chaque fraction est mélangée à 81 μ L de tampon de lyse A sans sel (0M KCl, 60mM MgOAc, 50mM Tris-HCl, pH 7,6). Cette dilution est nécessaire pour baisser la concentration en sel de la solution à 2M environ (2.13M) et ainsi éviter la précipitation du substrat.

Pour tester l'activité amino-peptidasique dans des S30, 20 μL de S30 est mixé avec 176 μL de tampon de lyse A (2.0M NaCl, 60mM MgOAc, 50mM Tris-HCl, pH 7,6) pour obtenir une concentration finale en KCl proche de 2M (2.13M).

On ajoute ensuite 2 μL de substrat (dont sa concentration initiale est à 40mM) et 2 μL de cofacteurs métalliques (dont la concentration initiale est à 100mM).

On effectue les mesures sur une plaque Greiner de 96 puits et trois contrôles sont réalisés : eau, tampon 2M KCl et substrat en présence du tampon 2M KCl. Les données sont ensuite traitées avec le logiciel Microsoft Excel Viewer 2007.

On calcule les coefficients directeurs de la droite de régression pour les valeurs situées dans la partie linéaire des courbes d'activité, auxquelles on soustrait les valeurs de coefficients directeurs de droite de régression obtenues pour la même fenêtre de temps pour le contrôle négatif du substrat en présence du tampon 2M KCl.

Chapitre 15

Technique de biophysique

15.1 Microscopie : visualisation des changements morphologiques

Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées avec Daphna FENNEL de la plateforme de microscopie de l'IBS sous la responsabilité de Guy SCHOEHN.

15.1.1 Microscopie par fluorescence pour visualisation des membranes

Pour les observations morphologiques, 15 μL de la culture est déposé sur lame. Le microscope à contraste de phase (Olympus Bx UCB couplé à la caméra Retigo SRV, voir chapitre 13.2.3) est utilisé, pour observer les différences morphologiques des cellules au cours des stress.

Pour la visualisation des membranes, on utilise le composé fluorescent "FM 4-64" d'Invitrogen (ou N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide) qui s'insère dans la membrane où il devient intensément orange fluorescent (visualisation avec le filtre CY5).

100 μL de culture plus ou moins diluée sont incubés pendant quelques minutes avec 5

μL du composé FM 4-64, avant d'en déposer 15 μL sur lame.

15.1.2 Microscopie électronique coloration négative

Pour l'observation en microscopie à transmission, 250mg de cellules lavées ont été fixées avec 1mL d'une solution de fixation à la concentration en NaCl correspondante à celle du milieu de culture (4,2 M NaCl ou 0,5 M NaCl, 0,1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,04 M KCl, 0,01 M Tri sodium Citrate. $2\text{H}_2\text{O}$ (pH 7,5), 4% formaldéhyde et 2,5 % glutaraldéhyde), en agitation à 4°C pendant la nuit. 8 μL de l'échantillon est déposé sur une grille de mica recouverte de carbone de 5 mm^2 . Les cellules sont colorées négativement avec 2% (poids/volume) d'acétate d'uranyle. L'analyse est ensuite effectuée par un microscope électronique Philips CM12 équipé d'un filament LaB6, à 120kV. Les micrographies sont enregistrées à un agrandissement de 5000x.

15.1.3 Microscopie électronique par balayage

Pour l'observation au microscope à balayage, On sèche 10 μg de l'échantillon sur une plaque de silicium. On métalise l'échantillon par l'ajout d'une couche de 10 nm de platine avec le métaliseur Biorad2 SC500. On pourra ainsi récolter les électrons secondaires lors de l'observation au microscopique à l'aide d'un microscope S-4000, à 4,9 kV.

15.1.4 Microscopie électronique par coupe

Pour la microscopie à transmission de coupes d'*H. salinarum*, l'échantillon est lavé dans un tampon 4,2 M NaCl ou 0,5 M NaCl, puis fixé dans 1% paraformaldéhyde et 1,25% glutaraldéhyde pendant 4h à température ambiante. Une première fixation est réalisée avec du tetroxide d'osmium, puis une seconde avec de l'acide uranyle. L'échantillon est ensuite déshydraté en utilisant des concentrations croissantes d'éthanol. Puis on l'incube dans des concentrations croissantes en epon afin de rempla-

cer l'éthanol par cette résine. La prise de l'échantillon dans la résine a lieu pendant 48h à 60°C. On réalise ensuite des coupes ultra-fines à l'aide d'un microtome et on réalise une coloration à contraste à l'aide de deux colorants : l'acétate d'uranyle qui colore la chromatine et le citrate de plomb.

15.2 Dosage des ions intracellulaires

Après une heure de stress et détermination du nombre de cellules dans chaque échantillon par microscopie, trois aliquotes de 1mL de cellules en culture sont culottées par centrifugation (13200 rpm centrifugeuse de paillasse).

Chaque culot est lavé deux fois avec un tampon de lavage sans KCl (Tris 50mM pH7.5, 100mM $MgCl_2$, "X" M NaCl, "X" étant identique à la concentration initiale de l'échantillon et donc dépendant de la condition de stress). Les culots cellulaires sont ensuite lysés par sonication dans 10mL d' H_2O . Nous effectuons ensuite une gamme de dilution ($\times 1$, $\times 1/5$, $\times 1/10$, $\times 1/20$) de l'échantillon avec de l' H_2O , pour être sûr de rentrer dans la gamme étalon de l'appareil. La mesure de la concentration intracellulaire en K^+ est ensuite réalisée par spectrophotométrie de flamme (ICP-AES Perkin Elmer OPTIMA 3300 DV).

Une étude du volume moyen des cellules est nécessaire pour "remonter" à la concentration intracellulaire, cette étude a été réalisée par microscopie par contraste de phase sur un échantillon de 100 cellules (volume moyenne = $4 * 10^{-19}m^3$)(de plus la mesure a été vérifiée par microscopie électronique).

15.3 Dynamique moléculaire par diffusion de neutron

15.3.1 Préparation des échantillons

Après 1 heure de stress (pour les stress salins) et 2 heures de stress (pour le stress thermique), les cellules sont culottées par centrifugation à 4000 rpm dans une centrifugeuse Beckman (rotor JLA10500) pendant 30 minutes à température ambiante.

Le surnageant est écarté et le culot est lavé avec 200mL de tampon de lavage adapté au stress, c'est à dire :

- pour la condition dite normale et pour les conditions de stress thermique : 4.2M NaCl, 70mM KCl, 80mM MgSO₄, 50mM Tris- HCl pH 7.6
- pour les stress bas sel 2.5M et 2.0M respectivement : 2.5M ou 2.0M NaCl, 70mM KCl, 80mM MgSO₄, 50mM Tris- HCl pH 7.6

540mg du culot lavé est ensuite transféré dans un porte échantillon plat en aluminium plaqué or pour analyse au neutron dont le couvercle laisse 0.3mm d'épaisseur, un fil d'indium de 1.5mm d'épaisseur sert de joint et des vis en aluminium sont nécessaires pour sceller le porte échantillon.

Un scan élastique (angle de l'échantillon à 135° par rapport au faisceau) de 4h est ensuite réalisé pour les températures : 280k ; 287k ; 294k ; 302k ; 310k. En fin d'expérience, une petite fraction du culot utilisé est re-suspendu dans du tampon de lavage afin de vérifier la viabilité par microscopie par fluorescence (Live/dead), cet échantillon est nommé t=24h. Le nombre de cellule ainsi que la viabilité sont comparés aux résultats obtenus avant l'application du stress (nommé t=0) et après l'application du stress (nommé t=1h).

Pour pouvoir normaliser les intensités obtenues pour l'échantillon, il est nécessaire de mesurer un scan élastique du tampon de lavage pendant 2h pour chaque température ; du porte échantillon vide (2h à 300k) ; du vanadium 2mm d'épaisseur pendant une quinzaine d'heure à une température (300k) ; ainsi que la transmission (angle de l'échantillon

à 90° par rapport au faisceau), de chaque échantillon et élément de contrôle pendant 5min.

15.3.2 Analyse des données

Pour l'analyse des données, nous utilisons dans un premier temps le logiciel LAMP (Large Array Manipulation Program neutron data analysis) pour normaliser les échantillon par rapport au vanadium et à la cellule vide. La suite des calculs est réalisée à l'aide du logiciel d'analyse Origin.

Septième partie

Annexes

Chapitre 16

Thermal and salt stress regulation of the PAN-proteasome system in the extreme halophilic Archaeon *Halobacterium*.

Stress regulation of the PAN–proteasome system in the extreme halophilic archaeon *Halobacterium*

H. Chamieh · V. Marty · D. Guetta ·
A. Perollier · B. Franzetti

Received: 14 July 2011 / Accepted: 13 December 2011
© Springer 2012

Abstract In Archaea, the importance of the proteasome system for basic biological processes is only poorly understood. Proteasomes were partially purified from *Halobacterium* by native gradient density ultracentrifugation. The peptidase activity profiles showed that the 20S proteasome accumulation is altered depending on the physiological state of the cells. The amount of active 20S particles increases in *Halobacterium* cells as a response to thermal and low salt stresses. In the same conditions, Northern experiments showed a positive transcriptional regulation of the alpha and beta proteasome subunits as well as of the two proteasome regulatory ATPases, PANA and PANB. Co-immunoprecipitation experiments demonstrated the existence of a physical interaction between the two Proteasome Activating Nucleotidase (PAN) proteins in cell extracts. Thus, a direct regulation occurs on the PAN–proteasome components to adjust the protein degradation activity to growth and environmental constraints. These results also indicate that, in extreme halophiles, proteasome mediated proteolysis is an important aspect of low salt stress response. The tri-peptide vinyl sulfone inhibitor NLVS was used in cell cultures to study the in vivo

function of proteasome in *Halobacterium*. The chemical inhibition of proteasomes was measured in the cellular extracts. It has no effect on cell growth and mortality under normal growth conditions as well as under heat shock conditions. These results suggest that the PAN activators or other proteases compensate for loss of proteasome activity in stress conditions.

Keywords Archaea · Proteasome · AAA-ATPase · Salt stress · Halophiles

Introduction

Protein degradation is a controlled process that eliminates the damaged or the misfolded protein that could not be rescued by the chaperone system in order to prevent their intracellular aggregation (Sherman and Goldberg 2001). Protein hydrolysis therefore represents an important aspect of the environmental stress response as well as of the protein quality control (Goldberg 2003). A selective proteolysis also occurs in order to provide an irreversible way of inactivating, at the appropriate times, the regulatory molecules involved in cell cycle progression or in metabolic switches (Coux et al. 1996). In eukaryotes, the ATP-dependent ubiquitin/26S proteasome system is the main proteolytic machinery (Lee and Goldberg 1996). The 26S proteasome can be separated in two subparticles: the 20S self-compartmentalized peptidase core and the 19S dependent regulatory particle (RP) (Zwickl and Baumeister 1999). Six regulatory subunits (Rpt) form the base of the RP (Patel and Latterich 1998; Rubin et al. 1998). These proteins belong to a large family of proteins known as the AAA ATPases (Atpases Associated with a variety of cellular Activities) (Patel and Latterich 1998). They recognize specific proteins as targets

Communicated by S. Albers.

H. Chamieh · V. Marty · D. Guetta · A. Perollier ·
B. Franzetti (✉)
Extremophiles and Large Molecular Assemblies Group,
UMR5075, CNRS, Institut de Biologie Structurale,
41 rue J. Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France
e-mail: franzetti@ibs.fr

H. Chamieh · V. Marty · D. Guetta · A. Perollier · B. Franzetti
CEA, 38054 Grenoble, France

H. Chamieh · V. Marty · D. Guetta · A. Perollier · B. Franzetti
Université Joseph Fourier, 38000 Grenoble, France

Huitième partie

Bibliographie

Bibliographie

- [1] L. J. Rothschild and R. L. Mancinelli. Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823) :1092–101, 2001.
- [2] R. A. Zierenberg, M. W. Adams, and A. J. Arp. Life in extreme environments : hydrothermal vents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24) :12961–2, 2000.
- [3] M. Kottemann and all. Physiological responses of the halophilic archaeon halo-bacterium sp. strain nrc1 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles*, 9 :219–27, 2005.
- [4] C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis. Towards a natural system of organisms : proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 :4576–9, 1990.
- [5] P. Londei. Evolution of translational initiation : new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 29 :185–200, 2005.
- [6] J. Soppa. From genomes to function : haloarchaea as model organisms. *Microbiology*, 152 :585–90, 2006.
- [7] K. S. Makarova and E. V. Koonin. Comparative genomics of archaea : how much have we learned in six years, and what’s next? *Genome Biol*, 4 :115, 2003.
- [8] G. J. Olsen and C. R. Woese. Lessons from an archaeal genome : what are we learning from methanococcus jannaschii? *Trends Genet*, 12(10) :377–9, 1996.
- [9] H. Myllykallio and all. Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science*, 288(5474) :2212–5, 2000.

- [10] S. D. Bell and S. P. Jackson. Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr Opin Microbiol*, 4(2) :208–13, 2001.
- [11] B. Grabowski and Z. Kelman. Archeal dna replication : eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol*, 57 :487–516, 2003.
- [12] M. Kates. Biology of halophilic bacteria, part ii. membrane lipids of extreme halophiles : biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia*, 49(12) :1027–36, 1993.
- [13] C. D. Litchfield. Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early mars. *Meteorit Planet Sci*, 33(4) :813–9, 1998.
- [14] F. Andrawes and all. Gas chromatographic analysis of volatiles in fluid and gas inclusions. *J Chromatogr*, 302 :181–93, 1984.
- [15] H. Stan-Lotter and all. Comparison of membrane atpases from extreme halophiles isolated from ancient salt deposits. *Orig Life Evol Biosph*, 23(1) :53–64, 1993.
- [16] R. H. Vreeland and all. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407(6806) :897–900, 2000.
- [17] C.F. Norton and W.D. Grant. Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *Microbiology*, 134(5) :1365–73, 1988.
- [18] S. Dassarma and all. Genomic perspective on the photobiology of halobacterium species nrc-1, a phototrophic, phototactic, and uv-tolerant haloarchaeon. *Photosynth Res*, 70(1) :3–17, 2001.
- [19] E. S. Courtenay and all. Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions : implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of ”osmotic stress” experiments in vitro. *Biochemistry*, 39(15) :4455–71, 2000.
- [20] J. Zabner and all. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21) :11614–9, 2000.

- [21] J. H. Christian and J. A. Waltho. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 65 :506–8, 1962.
- [22] J. K. Lanyi. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, 38(3) :272–90, 1974.
- [23] A. Oren. Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4 :2, 2008.
- [24] A. Oren. Halophilic microorganisms and their environments. *published in Kluwer Academic book, cellular origin and life in extreme habitats*, 5, 2002.
- [25] R. A. Bogomolni. Light energy conservation processes in halobacterium halobium cells. *Fed Proc*, 36(6) :1833–9, 1977.
- [26] H. Michel and D. Oesterhelt. Light-induced changes of the ph gradient and the membrane potential in h. halobium. *FEBS Lett*, 65(2) :175–8, 1976.
- [27] W. Marwan and all. Mechanism of photosensory adaptation in halobacterium salinarium. *J Mol Biol*, 246(4) :493–9, 1995.
- [28] N. J. Brown-Peterson and all. Enhanced superoxide production by membrane vesicles from halobacterium halobium in a hyposaline environment. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(3) :1736–40, 1994.
- [29] D. Madern and all. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2) :91–8, 2000.
- [30] A. Oren. Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4 :2, 2008.
- [31] D. Madern and all. Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from haloarcula marismortui in physiological salts. *Eur J Biochem*, 230(3) :1088–95, 1995.
- [32] L. Costenaro, G. Zaccai, and C. Ebel. Link between protein-solvent and weak protein-protein interactions gives insight into halophilic adaptation. *Biochemistry*, 41 :13245–52, 2002.

- [33] N. Coquelle and all. Gradual adaptive changes of a protein facing high salt concentrations. *J Mol Biol*, 404(3) :493–505, 2010.
- [34] O. Dym and all. Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaebacterium. *Science*, 267(5202) :1344–6, 1995.
- [35] D. Madern, C. Ebel, and G. Zaccai. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2) :91–8, 2000.
- [36] J. Coker and all. Transcriptional profiling of the model archaeon halobacterium sp. nrc-1 : responses to changes in salinity and temperature. *Saline Systems*, 3 :6, 2007.
- [37] Ginzburg M. and Ginzburg B.Z. Regulation of cell volume and ion concentration in a halobacterium. *J Membrane Biol.*, 26 :153–72, 1976.
- [38] H. D. Shukla. Proteomic analysis of acidic chaperones, and stress proteins in extreme halophile halobacterium nrc-1 : a comparative proteomic approach to study heat shock response. *Proteome Sci*, 4 :6, 2006.
- [39] M. Kottemann, A. Kish, C. Iloanusi, S. Bjork, and J. DiRuggiero. Physiological responses of the halophilic archaeon halobacterium sp. strain nrc1 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles*, 9(3) :219–27, 2005.
- [40] Mullakhanbhai MF and Larsen H. Halobacterium volcanii spec. nov., a dead sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch Microbiol.*, 28(104) :207–14, 1975.
- [41] A. L. Goldberg. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968) :895–9, 2003.
- [42] A. Varshavsky. Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*, 30(6) :283–6, 2005.
- [43] M. Hochstrasser. Protein degradation or regulation : Ub the judge. *Cell*, 84(6) :813–5, 1996.
- [44] R. Hengge and B. Bukau. Proteolysis in prokaryotes : protein quality control and regulatory principles. *Mol Microbiol*, 49(6) :1451–62, 2003.

- [45] M. Kirschner. Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol*, 9(12) :42–5, 199.
- [46] S. Ottosen, F. J. Herrera, and S. J. Triezenberg. Transcription. proteasome parts at gene promoters. *Science*, 296(5567) :479–81, 2002.
- [47] P. M. Kloetzel. Generation of major histocompatibility complex class i antigens : functional interplay between proteasomes and tppii. *Nat Immunol*, 5(7) :661–9, 2004.
- [48] M. Y. Sherman and A. L. Goldberg. Cellular defenses against unfolded proteins : a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 29(1) :15–32, 2001.
- [49] S. Wickner, M. R. Maurizi, and S. Gottesman. Posttranslational quality control : folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286(5446) :1888–93, 1999.
- [50] M. J. Gething and J. Sambrook. Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355) :33–45, 1992.
- [51] L. Ellgaard and A. Helenius. Er quality control : towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol*, 16(4) :431–7, 2001.
- [52] D. H. Lee and A. L. Goldberg. Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271(44) :27280–4, 1996.
- [53] A. Hershko and A. Ciechanover. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67 :425–79, 1998.
- [54] J. M. Peters, W. W. Franke, and J. A. Kleinschmidt. Distinct 19 s and 20 s subcomplexes of the 26 s proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, 269(10) :7709–18, 1994.
- [55] J. Lowe and all. Crystal structure of the 20s proteasome from the archaeon *t. acidophilum* at 3.4 a resolution. *Science*, 268(5210) :533–9, 1995.
- [56] M. Orłowski, C. Cardozo, and C. Michaud. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex.

- properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry*, 32(6) :1563–72, 1993.
- [57] C. Cardozo. Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein*, 47(4-6) :296–305, 1993.
- [58] A.J. Rivett. Characterization of proteasomes isolated from rat liver. *Enzyme Protein*, 47(4-6) :210–9, 1993.
- [59] P. Zwickl and W. Baumeister. Aaa-atpases at the crossroads of protein life and death. *Nat Cell Biol*, 1(4) :E97–8, 1999.
- [60] S. Patel and M. Latterich. The aaa team : related atpases with diverse functions. *Trends Cell Biol*, 8(2) :65–71, 1998.
- [61] M.H. Glickman, D.M. Rubin, V.A. Fried, and D. Finley. The regulatory particle of the *saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol*, 18(6) :3149–62, 1998.
- [62] A.F. DaNeuwald, L. Aravind, J.L. Spouge, and E.V. Koonin. Aaa+ : A class of chaperone-like atpases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, 9(1)) :27–43, 1999.
- [63] R.D. Vale. Aaa proteins. lords of the ring. *J Cell Biol*, 150(1) :F13–9, 2000.
- [64] M. *et al.* Groll. Structure of 20s proteasome from yeast at 2.4 a resolution. *Nature*, 386(6624) :463–71, 1997.
- [65] S. Gottesman. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19 :565–87, 2003.
- [66] A. N. Lupas and J. Martin. Aaa proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 12 :746–53, 2002.
- [67] A. Mogk and B. Bukau. Molecular chaperones : structure of a protein disaggregase. *Curr Biol*, 12(2) :78–80, 2004.
- [68] J. A. Maupin-Furlow, H. L. Wilson, S. J. Kaczowka, and M. S. Ou. Proteasomes in the archaea : from structure to function. *Front Biosci*, 5 :D837–65, 2000.

- [69] P. Zwickl, D. Ng, K. M. Woo, H. P. Klenk, and A. L. Goldberg. An archaeobacterial atpase, homologous to atpases in the eukaryotic 26 s proteasome, activates protein breakdown by 20 s proteasomes. *J Biol Chem*, 274(37) :26008–14, 1999.
- [70] R. J. Mayer, A. J. Ciechanover, and M. Rechsteiner. Dans le livre "protein degradation : Cell biology of the ubiquitin-proteasome system,". eds, 3, 2007.
- [71] N. Benaroudj, P. Zwickl, E. Seemuller, W. Baumeister, and A. L. Goldberg. Atp hydrolysis by the proteasome regulatory complex pan serves multiple functions in protein degradation. *Mol Cell*, 11(1) :69–78, 2003.
- [72] S. Witt, Y. D. Kwon, M. Sharon, K. Felderer, M. Beuttler, C. V. Robinson, W. Baumeister, and B. K. Jap. Proteasome assembly triggers a switch required for active-site maturation. *Structure*, 14(7) :1179–88, 2006.
- [73] A. Navon and A. L. Goldberg. Proteins are unfolded on the surface of the atpase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell*, 8(6) :1339–49, 2001.
- [74] A. Forster and all. The 1.9 a structure of a proteasome-11s activator complex and implications for proteasome-pan/pa700 interactions. *Mol Cell*, 18(5) :589–99, 2005.
- [75] M. A. Humbard and all. Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (samps) in haloferax volcanii. *Nature*, 463(7277) :54–60, 2010.
- [76] T. Fukui, T. Eguchi, H. Atomi, and T. Imanaka. A membrane-bound archaeal lon protease displays atp-independent proteolytic activity towards unfolded proteins and atp-dependent activity for folded proteins. *J Bacteriol*, 184(13) :3689–98, 2002.
- [77] H. Besche and P. Zwickl. The thermoplasma acidophilum lon protease has a ser-lys dyad active site. *Eur J Biochem*, 271(22) :4361–5, 2004.
- [78] T. Gonzales and J. Robert-Baudouy. Bacterial aminopeptidases : properties and functions. *FEMS Microbiol Rev.*, 18 :319–44, 1996.

- [79] R. E. De Castro, J. A. Maupin-Furlow, M. I. Gimenez, M. K. Herrera Seitz, and J. J. Sanchez. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems. *FEMS Microbiol Rev*, 30(1) :17–35, 2006.
- [80] N. Tamura, F. Lottspeich, W. Baumeister, and T. Tamura. The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell*, 95(5) :637–48, 1998.
- [81] B. Franzetti and all. Tetrahedral aminopeptidase : a novel large protease complex from archaea. *Embo J*, 21 :2132–2138, 2002.
- [82] G. Schoehn, F. M. Vellieux, M. Asuncion Dura, V. Receveur-Brechot, C. M. Fabry, R. W. Ruigrok, C. Ebel, A. Roussel, and B. Franzetti. An archaeal peptidase assembles into two different quaternary structures : A tetrahedron and a giant octahedron. *J Biol Chem*, 281(47) :36327–37, 2006.
- [83] M. A. Dura, V. Receveur-Brechot, J. P. Andrieu, C. Ebel, G. Schoehn, A. Roussel, and B. Franzetti. Characterization of a tet-like aminopeptidase complex from the hyperthermophilic archaeon pyrococcus horikoshii. *Biochemistry*, 44(9) :3477–86, 2005.
- [84] M. A. Dura, E. Rosenbaum, A. Larabi, F. Gabel, F. M. Vellieux, and B. Franzetti. The structural and biochemical characterizations of a novel tet peptidase complex from pyrococcus horikoshii reveal an integrated peptide degradation system in hyperthermophilic archaea. *Mol Microbiol.*, 72 :26–40, 2006.
- [85] D. Zhong. Ultrafast catalytic processes in enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 11(2) :174–81, 2007.
- [86] G. Zaccai. Neutron scattering perspectives for protein dynamics. *J. Non-Cryst. Solids*, 357 :615–21, 2011.
- [87] A. Minton. Effect of a concentrated ”inert” macromolecular cosolute on the stability of a globular protein with respect to denaturation by heat and by chaotropes : a statistical-thermodynamic model. *Biophys J*, 78(1) :101–9, 2000.

- [88] S. B. Zimmerman and S. O. Trach. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of escherichia coli. *J Mol Biol*, 222(3) :599–620, 1991.
- [89] S. Sundararaj and all. The cybercell database (ccdb) : a comprehensive, self-updating, relational database to coordinate and facilitate in silico modeling of escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 32 :D293–5, 2003.
- [90] R. J. Ellis. Macromolecular crowding : an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, 11 :114–9, 2001.
- [91] S. B. Zimmerman and A. P. Minton. Macromolecular crowding : biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 22 :27–65, 1993.
- [92] B. Merrifield. Dans le livre ”peptides : Synthesis, structures and applications”. *Edition Gutte Bernd*, pages 93–169, 1995.
- [93] V. Dartois and all. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 49 :3302–3310, 2005.
- [94] M. Jasnin. Bioneutronique : la diffusion de neutrons pour l’étude de la dynamique des protéines. *Spectra Analyse*, 35(251) :28–32, 2006.
- [95] G. Zaccai. How soft is a protein? a protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, 288(5471) :1604–7, 2000.
- [96] M. Tehei and all. Adaptation to extreme environments : macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO*, 5 :66–70, 2004.
- [97] M. Jasnin and all. In vivo measurement of internal and global macromolecular motions in escherichia coli. *Biophys J*, 95 :857–64, 2008.
- [98] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius. Isolation of the cell membrane of halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol*, 31 :667–78, 1974.

- [99] M. Tehei and all. Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and bsa measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 :14356–61, 2001.
- [100] Z. Bu, J. Cook, and D. J. Callaway. Dynamic regimes and correlated structural dynamics in native and denatured alpha-lactalbumin. *J Mol Biol Evol*, 312 :865–73, 2001.
- [101] V. Receveur and all. Picosecond dynamical changes on denaturation of yeast phosphoglycerate kinase revealed by quasielastic neutron scattering. *Proteins*, 28 :380–7, 1997.
- [102] M. Klumpp and W. Baumeister. The thermosome : archetype of group ii chaperonins. *FEBS*, 430 :73–7, 1998.
- [103] S. Leuko and all. Global protein-level responses of halobacterium salinarum nrc-1 to prolonged changes in external sodium chloride concentrations. *J Proteome Res*, 8 :2218–25, 2009.
- [104] B. Franzetti, G. Schoehn, C. Ebel, J. Gagnon, R. W. Ruigrok, and G. Zaccai. Characterization of a novel complex from halophilic archaeobacteria, which displays chaperone-like activities in vitro. *J Biol Chem*, 276(32) :29906–14, 2001.
- [105] B. Franzetti and all. Characterization of the proteasome from the extremely halophilic archaeon haloarcula marismortui. *Archaea*, 1 :53–61, 2002.
- [106] W. Stoeckenius and R. Rowen. A morphological study of halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration. *J Cell Biol*, 34(1) :365–93, 1967.
- [107] A.P.A. Oxley and all. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. *Environ Microbiol*, 12 :2398–2410, 2010.
- [108] C.F. Norton and W.D. Grant. Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystal. *J Gen Microbiol*, 134 :1365–73, 1988.
- [109] N.E. Gibbons. Studies of salt fish. 1. bacteria associated with the reddening of salt fish. *J Biol Board Can*, 3 :70–6, 1936.

- [110] C.F. Norton, T.J. McGenity, and W.D. Grant. Archaea halophiles (halobacteria) from two british salt mines. *J Gen Microbiol*, 139 :1077–81, 1993.
- [111] C. Zeng and all. Investigation of the influence of nacl concentration on halobacterium salinarum growth. *Journal of thermal Analysis and calorimetry*, 84(3) :625–30, 2006.
- [112] M. J. de Hoon, P. Eichenberger, and D. Vitkup. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol*, 20(17) :735–45, 2010.
- [113] S. Leuko, M. J. Raftery, B. P. Burns, M. R. Walter, and B. A. Neilan. Global protein-level responses of halobacterium salinarum nrc-1 to prolonged changes in external sodium chloride concentrations. *J Proteome Res*, 8(5) :2218–25, 2009.
- [114] V. Muller, R. Spanheimer, and H. Santos. Stress response by solute accumulation in archaea. *Curr Opin Microbiol*, 8(6) :729–36, 2005.
- [115] K. A. Bidle. Differential expression of genes influenced by changing salinity using rna arbitrarily primed pcr in the archaeal halophile haloferax volcanii. *Extremophiles*, 7(1) :1–7, 2003.
- [116] F. J. Mojica, E. Cisneros, C. Ferrer, F. Rodriguez-Valera, and G. Juez. Osmotically induced response in representatives of halophilic prokaryotes : the bacterium halomonas elongata and the archaeon haloferax volcanii. *J Bacteriol*, 179(17) :5471–81, 1997.
- [117] H. Chamieh, D. Guetta, and B. Franzetti. The two pan atpases from halobacterium display n-terminal heterogeneity and form labile complexes with the 20s proteasome. *Biochem J*, 411 :387–97, 2008.
- [118] Q. Chen, J. Thorpe, Q. Ding, I. S. El-Amouri, and J. N. Keller. Proteasome synthesis and assembly are required for survival during stationary phase. *Free Radic Biol Med*, 37(6) :859–68, 2004.
- [119] C. J. Reuter and J. A. Maupin-Furlow. Analysis of proteasome-dependent proteolysis in haloferax volcanii cells, using short-lived green fluorescent proteins. *Appl Environ Microbiol*, 70(12) :7530–8, 2004.

- [120] B. Franzetti, G. Schoehn, J. F. Hernandez, M. Jaquinod, R. W. Ruigrok, and G. Zaccai. Tetrahedral aminopeptidase : a novel large protease complex from archaea. *Embo J*, 21(9) :2132–8, 2002.
- [121] A. Ruepp, C. Eckerskorn, M. Bogyo, and W. Baumeister. Proteasome function is dispensable under normal but not under heat shock conditions in thermoplasma acidophilum. *FEBS Lett*, 425(1) :87–90, 1998.
- [122] T. N. Akopian, A. F. Kisselev, and A. L. Goldberg. Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from thermoplasma acidophilum. *J Biol Chem*, 272(3) :1791–8, 1997.
- [123] B. Franzetti, G. Schoehn, D. Garcia, R. W. Ruigrok, and G. Zaccai. Characterization of the proteasome from the extremely halophilic archaeon haloarcula marismortui. *Archaea*, 1(1) :53–61, 2002.
- [124] D.M. Rubin and all. Active site mutants in the six regulatory particle atpases reveal multiple roles for atp in the proteasome. *Embo J*, 417 :4909–19, 1998.
- [125] J. Martin, M. Gruber, and A. N. Lupas. Coiled coils meet the chaperone world. *Trends Biochem Sci*, 29(9) :455–8, 2004.
- [126] G. Zhou, D. Kowalczyk, M. A. Humbard, S. Rohatgi, and J. A. Maupin-Furrow. Proteasomal components required for cell growth and stress responses in the haloarchaeon haloferax volcanii. *J Bacteriol*, 190(24) :8096–105, 2008.
- [127] R. Glas, M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczynska, and H. L. Ploegh. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature*, 392(6676) :618–22, 1998.
- [128] C. J. Reuter, S. J. Kaczowka, and J. A. Maupin-Furrow. Differential regulation of the pana and panb proteasome-activating nucleotidase and 20s proteasomal proteins of the haloarchaeon haloferax volcanii. *J Bacteriol*, 186(22) :7763–72, 2004.
- [129] T. Allers and M. Mevarech. Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet*, 6(1) :58–73, 2005.

- [130] A. L. Hartman, C. Norais, J. H. Badger, S. Delmas, S. Haldenby, R. Madupu, J. Robinson, H. Khouri, Q. Ren, T. M. Lowe, J. Maupin-Furlow, M. Pohlschroder, C. Daniels, F. Pfeiffer, T. Allers, and J. A. Eisen. The complete genome sequence of haloferax volcanii ds2, a model archaeon. *PLoS One*, 5(3) :e9605, 2010.
- [131] R. A. Caldwell, R. C. Boucher, and M. J. Stutts. Serine protease activation of near-silent epithelial na⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(1) :C190–4, 2004.